(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119730868 A
(43)申请公布日 2025.03.28

(21)申请号 202380053577.6
(22)申请日 2023.05.25
(30)优先权数据
22305773.8 2022.05.25 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/064091 2023.05.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/227731 EN 2023.11.30
(71)申请人 塔法吉斯生技公司
地址 法国马赛
(72)发明人 A·莫克利奇 S·盖拉德
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 涂滔
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61P 25/04(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
C07K 14/52(2006.01)

权利要求书2页 说明书33页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

用于治疗疼痛的肽和方法

(57)摘要

本发明涉及肽的组、包含或允许表达所述肽的组合物和试剂盒,以及其用途,尤其是用于预防或治疗有此需要的受试者的疼痛。

CN 119730868 A

1.组合物,其包含第一肽和第二肽,所述第一肽为SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽,所述第二肽为SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽,其中所述两个肽彼此不连接。

2.权利要求1所述的组合物,其中如果所述组合物包含与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽和/或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽,则SEQ ID NO:1的肽中位置13处的谷氨酰胺(Q)残基在所述与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽的氨基酸序列中保持不变,并且SEQ ID NO:2的肽中位置18处的酪氨酸(Y)残基在所述与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽的氨基酸序列中保持不变或者被丝氨酸(S)替换。

3.组分或组合物的组,所述组包含允许表达彼此不连接的两个肽的核酸,其中第一核酸包含编码SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽的序列,并且第二核酸包含编码SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽的序列。

4.组分或组合物的组,所述组包含允许表达彼此不连接的两个肽的载体,其中第一载体包含编码SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽的序列,并且第二载体包含编码SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽的序列。

5.细胞或包含所述细胞和可接受的支持物的组合物,其中所述细胞允许表达彼此不连接的两个肽,并且其中所述细胞包含编码SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽的第一核酸序列或载体,和编码SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽的第二核酸序列或载体。

6.权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包含至少一种另外的活性化合物,优选对疼痛有效的活性化合物,甚至更优选SAID、NSAID或阿片类药物。

7.权利要求1-6中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含药学上和/或饮食上可接受的支持物。

8.权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包含抗坏血酸或抗坏血酸盐。

9.第一肽和第二肽的组、权利要求3或4所述的组、权利要求1-8中任一项所述的组合物或权利要求5所述的细胞,所述第一肽为SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽,所述第二肽为SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽,其中所述两个肽彼此不连接,其中所述组、组合物或细胞用作有此需要的受试者的药物。

10.第一肽和第二肽的组、权利要求3或4所述的组、权利要求1-8中任一项所述的组合物或权利要求5所述的细胞,所述第一肽为SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽,所述第二肽为SEQ ID NO:2的第二肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽,其中所述两个肽彼此不连接,其中所述组、组合物或细胞用于预防或治疗有此需要的受试者的疼痛。

11.权利要求10所述使用的组、组合物或细胞,其中疼痛是慢性疼痛、神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、关节炎疼痛、与关节损伤相关的疼痛、与埃勒斯-当洛斯综合征相关的疼痛、由晒伤引起的疼痛、由冰烧伤引起的疼痛、痛觉过敏、痛觉超敏或急性疼痛。

12.权利要求9-11中任一项所述使用的组、组合物或细胞,其中所述受试者是哺乳动物,尤其是人类。

13.权利要求9-12中任一项所述使用的组或组合物,其中所述组合物肌肉内、静脉内、

腹膜内、口服(经口)、经肛门、经皮肤、皮下地、外部地、经真皮、透皮地或鞘内地施用于所述受试者,优选皮下地或口服。

14.权利要求9-13中任一项所述使用的组或组合物,其中所述组或组合物每单位剂量包含1μg至100mg,优选25μg至10mg的所述第一肽和所述第二肽。

15.权利要求9-13中任一项所述使用的组或组合物,其中所述组或组合物以1μg/kg/天至100mg/kg/天,优选2.5μg/kg/天至0.6mg/kg/天的剂量对哺乳动物施用。

16.试剂盒,其包含i)第一肽,所述第一肽为SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽,或编码所述肽的核酸序列,ii)第二肽,所述第二肽为SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽,或编码所述肽的核酸,所述第一肽和所述第二肽或所述编码所述肽的核酸在不同的容器中,和任选地iii)用于使用所述试剂盒的书面说明书。

用于治疗疼痛的肽和方法

技术领域

[0001] 本发明整体涉及疼痛管理领域。更具体地,本发明涉及肽的组、包含或允许表达所述肽的组合物和试剂盒以及其用途,尤其是用于预防或治疗有此需要的受试者的疼痛。肽的组是人TAFA-4蛋白的特定片段或其等效片段,可用作预防或治疗疼痛的活性成分,特别是源自神经病理性疼痛、术后疼痛或炎症性疼痛的急性、亚急性或慢性疼痛,或用于预防和/或治疗由损伤引起的疼痛所导致的痛觉过敏或痛觉超敏。

背景技术

[0002] 疼痛通常分为急性疼痛或慢性疼痛。急性疼痛是短暂的,对于维持我们的身体完整性必不可少,而慢性疼痛则会持续超过正常的愈合时间,并对健康产生不利影响。慢性炎症、神经性或术后疼痛会引起长期感觉异常,例如痛觉过敏(由有害刺激引起的极度疼痛)和机械性痛觉超敏(由无害的机械刺激引起的疼痛)。这些疼痛类别在病因和临床特征方面有所不同,但它们具有几种共同的机制,包括神经免疫相互作用的改变以及神经元敏化(包括外周和中枢)(Costigan et al.,2009)。越来越多的证据表明,抑制丧失可能是慢性疼痛的关键机制(Bourane et al.,2015a;Bourane et al.,2015b;Boyle et al.,2019;Coull et al.,2005;Duan et al.,2014;Peirs et al.,2015;Petitjean et al.,2019;Petitjean et al.,2015;Zeilhofer et al.,2012;Zhang et al.,2018,Yoo et al.,2021)。然而,尽管我们对啮齿动物慢性疼痛的机制和回路有广泛的了解,但仍然不能满足将这些发现转化为人慢性疼痛的有效治疗(Colloca et al.,2017)。事实上,非甾体抗炎剂(NSAID)对慢性疼痛的疗效有限,而阿片类药物有多种副作用,包括潜在致命的呼吸抑制、恶心、便秘、痛觉过敏、耐受性、身体和心理依赖(Benyamin et al.,2008)。因此,应鼓励努力鉴定具有镇痛或止痛潜力的治疗慢性疼痛的新靶点。

[0003] 在过去的几年里,发明人发现了分泌蛋白TAFA-4的显著特征,表明它可能成为治疗慢性疼痛的感兴趣的药物(WO2014180853)。TAFA-4属于五种高度保守的分泌神经因子家族(Sarver et al.,2021)。TAFA-4含有信号肽,随后是具有10个半胱氨酸残基的高度保守的核心区域,包括使其类似于细胞因子的CC-趋化因子基序(Tom Tang et al.,2004)。

[0004] 发明人先前还证明,在将TAFA-4基因删除的小鼠中,神经损伤引起的机械超敏反应持续时间比野生型(WT)小鼠长得多(Delfini et al.,2013)。通过鞘内注射重组TAFA-4可以逆转这些表型。

[0005] 如WO2014180853中所述,发明人先前报道了实验证据,证明TAFA-4对病理性增加的机械疼痛具有强大的作用。研究表明,在雄性和雌性小鼠中,鞘内和皮下施用人重组TAFA-4可逆转炎症性、术后和神经损伤引起的机械超敏反应。他们还表明,TAFA-4可以逆转神经损伤引起的脊髓lamina Ii中间神经元的神经元敏化,据报道,脊髓lamina II中间神经元负责机械阈值改变。然而,由于TAFA-4是富含半胱氨酸的蛋白质(总共10个半胱氨酸),重组成熟TAFA-4蛋白的生产可能具有挑战性。事实上,重折叠可以导致获得非天然构象或不适当的二硫化物桥接模式,这可能会极大地影响蛋白质的活性。此外,获得高纯度重组

TAFA-4蛋白所需的数个纯化步骤以及可能的聚集问题可以限制正确折叠蛋白质的产量。此外,虽然实现了TAFA-4蛋白的化学合成,但是由于蛋白质的长度,也具有挑战性,需要组装不少于4个(保护或部分保护的)肽段(从N端开始,到最C端肽结束)。为了生成全长的TAFA-4,需要三个连接纯化步骤,导致产量低,不适合工业规模生产。因此,迫切需要替代的治疗剂和方法用于有效地预防或治疗疼痛,尤其是急性、亚急性或慢性疼痛,并且鉴定与全长TAFA-4蛋白具有相似或更好的活性的新型化合物将具有巨大的优势,这些化合物可以以工业规模和有成本效益的方式制备。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明至少部分地基于表现出镇痛或镇痛活性,尤其是镇痛活性的肽的鉴定。发明人已经发现,这些肽有利地能够逆转由神经损伤、手术或通过注射炎性剂(如角叉菜胶)诱导的机械超敏反应,即能够治疗神经性、术后或炎症性疼痛。

[0008] 感兴趣的肽是或衍生自人TAFA-4蛋白的特定片段。它们比人TAFA-4全长蛋白(本文也鉴定为"TAFA-4FL")更有效地针对疼痛,尤其是慢性疼痛,通常针对损伤诱导的疼痛,并且更容易生产。实际上,这些肽是不需要彼此连接来产生治疗效果的短肽。发明人在此向患者提供了能够缓解疼痛治疗成瘾问题的新工具。

[0009] 特别地,发明人在此第一次描述了产品或组分的组,尤其是肽的组、编码此类肽的核酸的组、允许此类肽表达的载体和/或细胞的组,该肽包含以下或由以下组成:第一肽和第二肽,第一肽为SEQ ID NO:1(CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW)或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽(在本文中也被鉴定为序列SEQ ID NO:1的"变体"、"肽变体"或"肽的变体"),第二肽为2(CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTK)或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽(在本文中也被鉴定为序列SEQ ID NO:2的"变体"、"肽变体"或"肽的变体"),其中所述(至少两个)肽彼此不连接。变体通常是功能性变体,即具有与发明人在本文中针对SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的肽描述的相同(治疗)效果的变体。

[0010] 本文还描述了组合物,其包含序列SEQ ID NO:1的肽或其变体(即,与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽),和序列SEQ ID NO:2的肽或其变体(即,与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽),其中所述(至少两个)肽彼此不连接。

[0011] 在特定的方面,与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽相似,其在此描述的变体调节脊髓中间神经元(优选脊髓lamina IIi中间神经元)的兴奋性。

[0012] 在优选的方面,SEQ ID NO:1的肽中位置13处(/参考SEQ ID NO:1中所示的位置)的谷氨酰胺(Q)残基在SEQ ID NO:1的肽的变体中保持不变。相似的,SEQ ID NO:2的肽中位置18处(/参考SEQ ID NO:2中所示的位置)的酪氨酸(Y)残基在SEQ ID NO:2的肽的变体中也保持不变或被丝氨酸(S)替换。

[0013] 发明人在此特别描述了允许表达彼此不连接的(至少两个)肽的核酸的组,以及包含此类核酸的组的组合物,其中(第一)核酸包含编码SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽的序列,并且(第二)核酸包含编码SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽的序列。

[0014] 本文还描述了允许彼此不连接的(至少两种肽)表达的载体的组,以及包含此类载体的组的组合物,其中(第一)载体包含编码SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽的序列,并且(第二)载体包含编码SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有

至少90％同一性的肽的序列。

[0015] 本文进一步公开了细胞,其允许表达彼此不连接的如本文所述的(至少两个)肽(或其变体),并且其中i)该细胞包含编码SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的肽的(第一)核酸序列或载体,和编码SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的肽的(第二)核酸序列或载体。还公开了包含此类细胞和可接受的支持物的组合物。

[0016] 本文还描述了本文首次公开的用作活性治疗或预防成分的组、组合物或细胞,通常用作药物组合物、药物或药品。

[0017] 本文描述的任何组合物通常是药物性、治疗性、兽医性或饮食性/膳食性组合物,其除了(至少两个)肽之外还包含药学上和/或饮食学上/膳食上可接受的支持物。

[0018] 在特定的方面,该组合物可以进一步包含至少一种另外的(不同的)活性化合物/活性剂,优选地是对疼痛(急性、亚急性或慢性疼痛)有效的活性剂,甚至更优选地是甾体抗炎药(SAID)、非甾体抗炎药(NSAID)或阿片类药物。

[0019] 本发明还涉及如本文所述的组或细胞,通常涉及肽、编码此类肽的核酸的组或允许此类肽表达的载体的组,或涉及包含或表达此类组的细胞,其用于[作为活性成分]预防或治疗有此需要的受试者的疼痛。本发明还涉及此类肽或此类组用于制备用于预防或治疗有此需要的受试者的疼痛的药物组合物、药物或药品的用途。具体地,本发明可用于治疗慢性疼痛、神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏、痛觉超敏或急性疼痛。本发明还可用于治疗关节炎疼痛、与关节损伤相关的疼痛、与埃勒斯-当洛斯综合征相关的疼痛、由晒伤引起的疼痛或由冰烧伤引起的疼痛。

[0020] 本发明还涉及预防或治疗有此需要的受试者疼痛的方法,其包括施用(治疗有效)量的如本文所述的产品,例如如本文所述的组和/或组合物,优选包含以下的肽的组:SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的其变体,和SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的其变体,或包含此类组的组合物。

[0021] 产品,尤其是本文所述的肽、组和组合物可以通过任何途径施用于受试者,例如肌肉内、静脉内、腹膜内、口服(经口)、经肛门、经皮肤、经皮下、局部地、经真皮、透皮或鞘内。优选地,将本文所述的产品(例如肽或组合物)经皮下、口服或静脉内施用至受试者,甚至更优选经皮下或口服。

[0022] 本文描述的每一个产品(例如肽)或每一个组合物可以是试剂盒的一部分。

[0023] 本发明的特定试剂盒包含:i)第一肽或编码此类肽的核酸序列,第一肽为SEQ ID NO:1、与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的肽,ii)第二肽或编码此类肽的核酸,第二肽为SEQ ID NO:2、与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的肽,第一肽和所述第二肽或编码所述肽的核酸在不同的容器中,和任选地iii)用于使用试剂盒的书面说明书。本文描述的试剂盒通常用于预防或治疗疼痛。

[0024] 在特定方面,本发明的产品还可以用于研究背景中。编码本文所述肽或其变体的核酸、允许其表达的载体,或包含此类核酸或使用此类载体修饰的细胞,可用于在体外或离体表达以下肽或调节以下肽的表达:SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的其功能变体和/或SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的其功能变体。在另一个特定的方面,本发明还涉及经过修饰以表达至少两种不同的本文所述的核酸

的转基因动物。

附图说明

[0025] 图1:TAFA-4(全长蛋白)和SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组在神经病理性疼痛的保留神经损伤(SNI)模型中体内皮下施用时的镇痛效果的比较。患有机械超敏反应的小鼠皮下施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(该组在此被标识为“肽1+2”)、TAFA-4全长蛋白(被标识为“TAFA4 FL”)、阴性对照(媒介物)或阳性对照(普瑞巴林)。该图示出了在每种条件下,在50%的小鼠中引发缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)随时间的变化。数据表示为相对于基线水平的百分比响应。这些测量是在实施SNI疼痛模型(T0=基线)之前进行的,在SNI之后14天进行以验证机械痛觉超敏的建立,然后在皮下注射后1、2和4小时进行。显示了“肽1+2”治疗的小鼠、“TAFA-4FL”治疗的小鼠和媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

[0026] 图2:TAFA-4(全长蛋白)和SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组在神经病理性疼痛的SNI模型中体内经口施用时的镇痛效果的比较。患有机械超敏反应的小鼠经口施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(该组在此被标识为“肽1+2”)、TAFA-4全长蛋白(被标识为“TAFA4 FL”)、阴性对照(媒介物)或阳性对照(普瑞巴林)。该图示出了在每种条件下,引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)随时间的变化。数据表示为相对于基线水平的百分比响应。这些测量是在实施SNI疼痛模型(T0=基线)之前进行的,在SNI之后14天进行以验证机械痛觉超敏的建立,然后在口腔灌胃后1、2和4小时进行。显示了“肽1+2”治疗的小鼠、“TAFA-4FL”治疗的小鼠和媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

[0027] 图3:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组在神经病理性疼痛的SNI模型中体内静脉施用时的镇痛效果。患有机械超敏反应的小鼠静脉施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(该组在此被标识为“肽1+2”)或阴性对照(媒介物)。该图示出了在每种条件下,引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)随时间的变化。数据表示为相对于基线水平的百分比响应。这些测量是在实施SNI疼痛模型(T0=基线)之前进行的,在SNI之后14天进行以验证机械痛觉超敏的建立,然后在静脉注射后1、2和4小时进行。显示了“肽1+2”治疗的小鼠和媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

[0028] 图4:SEQ ID NO:1和ID NO:NO2的两种肽的组在雄性和雌性小鼠中的术后疼痛模型(Brennan爪切口模型)中体内皮下施用时的镇痛效果。

[0029] A.方案的示意图。在不同时间点,每天两次皮下施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组或阴性对照(媒介物):手术前一天(D-1)、手术当天(D0)以及手术后D+1和D+2天。D0的施用分别在手术前1小时和手术后(和醒来)1小时进行。在施用两种肽的组或媒介物之前,在D+1天和D+2进行机械阈值反应测量。

[0030] B.该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(该组在本文中被标识为“肽1+2”)治疗的小鼠与用阴性对照(媒介物)治疗的小鼠进行比较。显示了“肽1+2”治疗的

小鼠和媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:***p<0.001)。“肽1+2”-治疗组:24只小鼠,媒介物组:22只小鼠;模型=术后疼痛模型;性别:12只雄性和12只雌性用于用“肽1+2”治疗的小鼠,11只雄性和11只雌性用于媒介物组;施用:皮下地;“肽1+2”的总浓度:300μg/kg。(大致对应于肽1:128μg/kg,对于肽2:172μg/kg)

[0031] 图5:在慢性压迫性损伤(CCI)神经病理性疼痛模型上重复皮下施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组后没有产生耐受性。

[0032] A.方案的示意图。在CCI神经病理性疼痛模型建立之后,在术后7天开始的连续14天期间,每天两次用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组(该组在本文中称为“肽1+2”)或阴性对照(媒介物)治疗小鼠。“肽1+2”的镇痛效果每两天确定一次。

[0033] B.该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将用“肽1+2”治疗的小鼠与用阴性对照(媒介物)治疗的小鼠进行比较。显示了第一次和最后一次施用“肽1+2”治疗的小鼠和媒介物组后的镇痛效果之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:ns:不显著)。模型=CCI神经病理性疼痛模型;性别:10只雄性用于“肽1+2”治疗的小鼠,对于媒介物组,n=9;施用:皮下地;“肽1+2”的总浓度:300μg/kg。

[0034] 图6:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组在雄性和雌性小鼠的术后疼痛模型(Brennan爪切口模型)中体内皮下施用的不同治疗剂量的比较。

[0035] A.方案的示意图。根据三种不同的方案,每天两次皮下施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(“肽1+2”)或阴性对照(媒介物)。“D-1/D0”方案:手术前一天(D-1)和手术当天(D0);“D0”方案:手术当天(D0);“D0/D+1/D+2”方案:手术前一天(D-1)、手术当天(D0)以及手术后D+1和D+2天。D0的施用分别在手术前1小时和手术后(和醒来)1小时进行。在施用两种肽的组或媒介物之前,在D+1天和D+2进行机械阈值反应测量。

[0036] B.该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。根据上述三种不同方案“D-1/D0”、“D0”、“D0/D+1/D+2”,将用“肽1+2”治疗的小鼠与用阴性对照(媒介物)治疗的小鼠进行比较。显示了“肽1+2”治疗的小鼠和媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:**p<0.01,***p<0.001)。“肽1+2”-治疗组:16只小鼠;媒介物组:11只小鼠;模型=术后疼痛模型;性别:8只雄性和8只雌性用于用“肽1+2”治疗的小鼠,6只雄性和5只雌性用于媒介物组;施用:皮下地;“肽1+2”的总浓度:300μg/kg。

[0037] 图7:在炎症性疼痛模型(辣椒素炎症性疼痛模型)中体内静脉施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组的镇痛效果。该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(该组在本文中被标识为“肽1+2”)治疗的小鼠与用阴性对照(媒介物)治疗的小鼠进行比较。显示了“肽1+2”治疗的小鼠和媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。;模型=炎症性疼痛模型;“肽1+2”-治疗组:8只小鼠媒介物组:8只雄性小鼠;施用:皮下地;“肽1+2”的总浓度:300μg/kg。

[0038] 图8:在骨关节炎疼痛模型(monoiodoacetate模型)中体内静脉施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组的镇痛效果。

[0039] 该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其

重量的当量)。将用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(该组在本文中被标识为“肽1+2”)治疗的小鼠与用阴性对照(媒介物)治疗的小鼠进行比较。显示了“肽1+2”治疗的小鼠和媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。;模型=骨关节炎疼痛模型;“肽1+2”-治疗组:8只小鼠,媒介物组:8只雄性小鼠;施用:皮下地;“肽1+2”的总浓度:300μg/kg。

[0040] 图9:在冻伤疼痛模型中体内静脉施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组的镇痛效果。

[0041] 该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(该组在本文中被标识为“肽1+2”)治疗的小鼠与用阴性对照(媒介物)治疗的小鼠进行比较。显示了“肽1+2”治疗的小鼠和媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。;模型=冻伤疼痛模型;“肽1+2”-治疗组:8只小鼠,媒介物组:8只雄性小鼠;施用:皮下地;“肽1+2”的总浓度:300μg/kg。

[0042] 图10:在紫外线烧伤疼痛模型中体内静脉施用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组的镇痛效果。

[0043] 该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。数据表示为对基线水平的百分比响应。将用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(该组在本文中被标识为“肽1+2”)治疗的小鼠与用阴性对照(媒介物)治疗的小鼠进行比较。显示了“肽1+2”治疗的小鼠和媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。;模型=紫外线烧伤疼痛模型;每组16只小鼠(8只雄性和8只雌性小鼠);施用:皮下地;“肽1+2”的总浓度:300μg/kg。

[0044] 发明详述

[0045] 定义

[0046] 本说明书中使用的术语通常具有其在本发明的上下文中以及使用每个术语的特定上下文中的本领域的普通含义。下面或说明书其他地方讨论了一些术语,以便为熟练的读者描述本发明的方法及如何使用这些方法提供额外的指导。此外,可以理解的是,可以用一种以上的方式说同一项目。因此,对于本文讨论的一个或多个术语可以使用替代语言和同义词。提供了某些术语的同义词。一个或多个同义词的叙述并不排除其他同义词的使用。

[0047] 术语“肽”、“肽变体”、“蛋白质片段”、“蛋白质区段”可互换使用,指氨基酸残基的序列或聚合物。此类氨基酸残基的聚合物可以含有天然或非天然的氨基酸残基。该术语还包括肽的表达后修饰,,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、酰胺化、磷酸化、氨基甲基化等。此外,在本发明的上下文中,“肽”是指蛋白质片段或区段,其可包括这种表达后修饰或这些修饰的组合,以及任选地对天然(野生型)序列的一种或几种修饰,例如缺失、添加和替换(通常在性质上是保守的),只要该肽保持期望的活性,即预防或治疗疼痛。这些修饰优选地是故意突变,例如通过定点诱变获得。

[0048] 术语“分离肽”是指从其原始环境(即,如果它是天然存在的,则是自然环境)中移除的肽。在天然系统中(例如在活体动物中)天然存在的肽应与从所述天然系统中的全部或部分共存材料中分离的相同肽相区别。分离的肽在此被称为“分离肽”。换句话说,在本发明的上下文中,分离肽是自然界中不存在的TAFA-4蛋白的片段。

[0049] 术语“合成肽”是指通过化学合成获得的肽。

[0050] 如本文所用,术语“肽的组”或“肽组”是指作为(该组的)活性成分组合使用的至少两种肽,其可能混合在组合物中但彼此不连接。如果有两种肽,则该组的肽不会通过任何键结合在一起(如果该组的肽多于两种,则这些肽不会相互结合),例如通过由肽(氨基酸序列)组成的键/链接,或通过化学性质或有机和化学性质两者的键/链接。该组的肽是分离的肽、合成的肽或其混合物。该组可以是干粉、溶液、悬浮液或胶体的形式,并且可以是均质的或非均质的。该组肽通常是组合物的一部分。组合物通常还包含药学上和/或饮食上可接受的支持物、载剂、赋形剂或媒介物。通常,赋形剂可以是抗坏血酸和/或抗坏血酸盐。抗坏血酸或L-酸抗坏血酸(IUPAC名称:(5R)-5-[(1S)-1,2-二羟乙基]-3,4-二羟基呋喃-2(5H)-酮)是天然存在的水溶性维生素,通常称为维生素C。抗坏血酸盐的示例包括但不限于抗坏血酸镁、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙和抗坏血酸棕榈酸酯。L-抗坏血酸及其钠盐是抗氧化剂,当与该组的肽组合使用时可用作防腐剂或稳定剂。也可以使用其它抗氧化剂(例如,甲硫氨酸)。

[0051] 术语“序列同一性”、“具有至少X%同一性的序列”和“X%相同的序列”,X例如是90,可互换使用,指在比较窗口内序列在核苷酸与核苷酸基础上或氨基酸与氨基酸基础上相同的程度。因此,可以通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列来计算“序列同一性百分比”,其中与参考序列相比,比较窗口中的多核苷酸或多肽序列部分可能包含添加或缺失(即缺口),以实现两个序列的最佳比对。该百分比可以通过确定两个序列中出现相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、U)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置数以产生匹配位置的数量来计算,将匹配位置的数量除以比较窗口中的总位置数(即,窗口大小),并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。或者,可以通过确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置数或核酸碱基或氨基酸残基与缺口比对的位置数以产生匹配位置的数量来计算百分比,将匹配位置的数量除以比较窗口中的总位置数,并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。优选地,在参考序列的整个长度上确定序列同一性,这里是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

[0052] 用于比较的序列的最佳比对可以通过以下进行:例如,通过Smith和Waterman,的局部同源性算法,(1981)Adv.Appl.Math.2:482,通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法,(1970)J.Mol.Biol.48:443,通过Pearson和Lipman的相似性搜索方法,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444,通过这些算法的计算机实现(GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或者通过目视检查(通常参见Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel et al.,eds.,Current Protocols,Greene Publishing Associates,Inc.and John Wiley&Sons,Inc.,(1995Supplement))。

[0053] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的实例是BLAST和BLAST 2.0算法,它们分别在Altschul et al.,(1990),J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul et al.,(1977)Nucleic Acids Res.3389-3402中描述。执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心网站公开获取。该算法首先通过识别查询序列中长度为“W”的短词来识别高分序列对(HSP),当与数据库序列中相同长度的词比对时,这些短词匹配或满足某个正值阈值评分“T”。T被称为邻域词评分阈值(Altschulet al.,supra)。这些初始的邻域词击中充

当启动搜索的种子,以找到包含它们的更长的HSP。然后,沿着每个序列在两个方向上扩展单词击中,直到累积比对评分可以增加为止。对于核苷酸序列,累积评分是使用参数"M"(一对匹配残基的奖励评分;始终>0)和"N"(错配残基的惩罚评分;始终<0)来计算的。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积评分。当出现以下情况时,每个方向的单词击中的延伸都会停止:累积比对评分从其最大达到值下降数量"X";由于一个或多个负评分残基比对的积累,累积评分变为零或以下;或者到达任一序列的末尾。BLAST算法参数W、T、X确定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)默认使用11的字长(W)、10的期望值("E")、M=5、N=-4,以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序默认使用3的字长(W)、10的期望值(E),以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff and Henikoff,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915)。

[0054] 氨基酸序列同一性百分比的程度也可以通过ClustalW分析(版本W1.8)来获得,通过计算比对中相同匹配的数量,然后将该相同匹配的数量除以参考序列的长度,并使用以下默认ClustalW参数来实现慢速/准确的成对最佳比对-缺口开放罚分:10;缺口延伸罚分:0.10;蛋白质权重矩阵:Gonnet系列;DNA权重矩阵:IUB;切换慢速/快速成对比对=慢速或完全比对。

[0055] 本文使用的术语"核酸"或"多核苷酸"是指任意长度的核苷酸的聚合形式,无论是核糖核苷酸还是脱氧核糖核苷酸。因此,这些术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体、或包含嘌呤和嘧啶碱基的聚合物、或其他天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基。多核苷酸的主链可以包含糖和磷酸基团(通常在RNA或DNA中发现),或者修饰或取代的糖或磷酸基团。或者,多核苷酸的主链可以包含合成亚基的聚合物,例如磷酸酰胺,因此可以是寡脱氧核苷磷酸酰胺(P-NH_2)或混合磷酸酰胺-磷酸二酯寡聚物。此外,可以通过合成互补链并在适当条件下使链退火,或者通过使用DNA聚合酶和适当的引物从头合成互补链,从化学合成的单链多核苷酸产物中获得双链多核苷酸。

[0056] 术语"表达盒"、"核酸构建体"或"核酸构建体"在本文中可互换使用,并且是指包含至少一个转录启动子的核酸,该转录启动子与一个或多个感兴趣的(编码)序列可操作地连接(具有本领域技术人员理解的含义),通常是指包含几个感兴趣的编码序列的操纵子,其表达产物有助于在细胞内产生感兴趣的功能,或指进一步包含激活序列和/或转录终止子的核酸。

[0057] 术语"载体"是指i)包含编码肽、多肽或蛋白质的多核苷酸序列(例如表达盒或转基因)的DNA或RNA分子,或ii)包封此类DNA或RNA分子的产物。载体通常含有能够指导编码多核苷酸序列(也称为转基因)在引入核酸分子的细胞中表达的调控元件。术语"转基因"是指引入细胞并能够转录为RNA并任选地在适当条件下翻译和/或表达的多核苷酸。在某些方面,它赋予引入它的细胞期望的特性,或以其他方式导致期望的技术效果,这里通常是治疗效果。转基因可能含有编码一种或多种蛋白质或一个或多个蛋白质片段的序列。在特定的方面,载体是质粒。或者,载体是能够人工携带如本文所述的感兴趣的外源核酸序列的任何众所周知的媒介物,如例如病毒载体、粘粒、噬菌体或包封如本文所述的感兴趣的产物可用于将其递送在感兴趣的位点上的双脂膜(如脂质体)等。

[0058] 术语"基因治疗"是指为了预防或治疗疾病而将基因/核酸递送到个体细胞中的受

试者的治疗。

[0059] 术语“转染”是指细胞(例如原核生物或真核生物细胞)吸收外来多核苷酸。当外源多核苷酸被引入细胞时,该细胞即被认定为“转染”。多种转染技术是本领域中公知的。参见,例如,Grahamet al.,Virology 52:456(1973),Sambrook et al,Molecular Cloning,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratories,New York(1989),Davis et al.,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier(1986),和Chuet al.,Gene 13:197(1981)。此类技术可用于将一种或多种外源核酸引入合适的宿主细胞。

[0060] 术语“转导”是指将核酸分子递送到受体宿主细胞中,例如通过基因递送载体,例如重组病毒载体,特别是逆转录病毒、腺病毒、重组腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒或慢病毒。例如,通过rAAV病毒体转导靶细胞会导致该病毒体中所含的rAAV载体转移到转导细胞中。

[0061] 重组“腺相关病毒(AAV)”是具有单链线性DNA基因组,缺乏致病性且免疫原性低的小型Dependoparvovirus,其使用重组方法人工产生。重组AAV(rAAV)优选具有组织/细胞特异性靶向能力,使得rAAV的转基因被特异性地或优选地递送到一个或多个预定的组织/细胞。AAV衣壳以及调节区的类型和施用途径是确定这些组织特异性靶向能力的重要因素。

[0062] 在本发明的上下文中,术语“疼痛”是指与组织损伤相关的任何疼痛或敏感。优选地,本文中使用的术语“疼痛”应理解为异常敏感性,即,通常为由所有类型的感觉神经元(包括伤害感受器和非伤害感受器)的异常增强的活性介导的超敏反应。术语疼痛包括选自下组的任何疼痛:伤害感受器介导的疼痛(本文中也称为“伤害性疼痛”)、神经病理性疼痛、炎症性疼痛、病理性疼痛、急性疼痛、亚急性疼痛、慢性疼痛、机械性疼痛、化学性疼痛、躯体疼痛、内脏疼痛、深部躯体疼痛、浅表躯体疼痛、躯体形式疼痛、痛觉超敏、痛觉过敏或与神经损伤相关的疼痛。

[0063] “伤害性”疼痛或“伤害感受器介导的”疼痛是由于强烈或有害刺激激活外周感觉神经元(伤害感受器)的特定子集的而发生的。根据本发明,伤害性疼痛包括机械性疼痛(挤压、撕裂等)和化学性疼痛(伤口处的碘、眼睛里的辣椒粉)。伤害性疼痛的实例包括但不限于创伤或手术疼痛、分娩疼痛、扭伤、骨折、烧伤、撞伤、擦伤、注射、牙科手术、皮肤活检和阻塞。伤害性疼痛包括内脏疼痛和躯体疼痛,特别是深部躯体疼痛和浅表躯体疼痛。

[0064] “内脏疼痛”是弥漫性的,难以定位,通常涉及远处的、通常是浅表的结构。它可能伴有恶心和呕吐,并可能被描述为令人恶心、深沉、挤压和/或沉闷。深部躯体疼痛是由韧带、肌腱、骨骼、血管、筋膜和肌肉中的伤害感受器的刺激引起的,是钝痛和局部不佳的疼痛。深部躯体疼痛的实例包括扭伤和骨折。浅表疼痛是由皮肤或其他浅表组织中的伤害感受器的激活引起的,并且是尖锐的、边界清晰的和位置明确的。产生浅表躯体疼痛的损伤的实例包括轻微伤口和轻微(一度)烧伤。

[0065] 在本发明的上下文中,术语“损伤引起的疼痛”涵盖神经病理性疼痛、炎症性疼痛和术后疼痛。

[0066] 炎症性疼痛是在组织损伤或炎症存在的情况下发生的疼痛,包括术后疼痛、创伤后疼痛、关节炎(类风湿性关节炎或骨关节炎)疼痛、与自身免疫性疾病(如牛皮癣)相关的疼痛以及与关节、肌肉和肌腱损伤相关的疼痛,如轴性下腰疼痛。炎症导致外周感觉神经元的敏感化,从而引起自发性疼痛并使疼痛超敏反应失效。急性或慢性病理组织炎症通过外

周感觉神经元的敏感化强烈影响疼痛知觉,引起局部和失能性疼痛超敏反应。已知炎症介质能够部分通过改变存在于神经末梢中的离子通道的表达和/或功能来增强伤害性初级传入纤维的兴奋性。

[0067] “神经病理性疼痛”是常见的慢性非恶性疼痛,是由于外周或中枢神经系统受伤或功能障碍引起的。神经病理性疼痛可能具有不同的病因,并且可能由于以下原因发生:例如,创伤、手术、椎间盘突出、脊髓损伤、糖尿病、带状疱疹感染(带状疱疹)、HIV/AID、晚期癌症、截肢(包括乳房切除术)、腕管综合症、长期饮酒、暴露于辐射以及神经毒性治疗药物(例如某些抗HIV和化疗药物)的意外副作用。特定类型的神经病理性疼痛是“化疗引起的外周神经病理性疼痛”(CIPN)或“化疗引起的神经病理性疼痛”(CINP)。CINP或CIPN是抗癌药物(例如铂类和紫杉烷衍生药物(奥沙利铂、顺铂、卡铂和紫杉醇))最严重的副作用之一。CINP甚至可以是中断治疗的因素,从而增加死亡风险。神经病理性疼痛通常以出现慢性痛觉超敏(定义为由通常不会引起疼痛反应的刺激所引起的疼痛,例如轻触)和/或痛觉过敏(定义为对通常疼痛刺激的增加的敏感性)为特征或导致其出现,并且可能会在任何受损组织明显愈合之后持续数月或数年。癌症患者也可能出现疼痛,这可能是由于炎症、压迫、侵袭、转移扩散到骨骼或其他组织等多种原因造成的。疼痛还包括偏头痛和与支配脑膜的感觉纤维的激活有关的头痛。

[0068] 本发明的产品,特别是肽、组、细胞或组合物,可用于预防或治疗慢性疼痛、神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏、痛觉超敏或急性疼痛。

[0069] 在另一个特定的实施方案中,本发明的产品,特别是肽、组、细胞或组合物,可用于预防或治疗关节炎疼痛、与关节损伤相关的疼痛、与埃勒斯-当洛斯综合征相关的疼痛、晒伤引起的疼痛或冰烧伤引起的疼痛

[0070] 特定地,本发明的产品,特别是肽、组、细胞或组合物,可用于预防或治疗,特别是治疗与埃勒斯-当洛斯综合征相关的疼痛,其包括慢性肌肉和/或骨骼和/或关节疼痛。本发明的产品,特别是肽、组、细胞或组合物,还可用于预防或治疗,特别是治疗由晒伤(即,由过度暴露于紫外线辐射引起的)引起的疼痛或由冰烧伤(也称为冷冻烧伤或冻伤)引起的疼痛。

[0071] 优选地,本发明的产品,特别是肽、组、细胞或组合物,用于预防或治疗损伤引起的疼痛。更优选地,本发明的产品,特别是肽、组、细胞或组合物,用于预防或治疗神经病理性疼痛(例如化疗引起的神经病理性疼痛或化疗引起的外周神经病理性疼痛)、术后疼痛和/或炎症性疼痛。

[0072] 通常,本发明的产品,特别是肽、组、细胞或组合物,用于预防或治疗慢性损伤引起的疼痛。通常,本发明的产品用于预防或治疗慢性神经病理性疼痛,例如慢性化疗引起的外周神经病理性疼痛(CIPN)、慢性化疗引起的神经病理性疼痛(CINP)或慢性神经损伤引起的疼痛;慢性术后疼痛;和/或慢性炎症性疼痛;与严重烧伤相关的或由严重烧伤引起的慢性疼痛。

[0073] 在本发明的上下文中,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”受试者的疼痛是指延迟、稳定、治愈、愈合、减轻、缓解、改变、改善、改进、补救或影响本文所述的受试者的任何形式的疼痛,或与疼痛相关的任何疾病或病症,特别是急性、亚急性或慢性疼痛(特别是与通常由神经病理性疼痛、术后疼痛或炎症性疼痛引起的慢性疼痛相关的任何神经性

病症),或此类疾病或病症的任何症状,在受试者暴露于本发明的合适产品或产品组之后,即应用或施用本发明的合适产品或产品的组,特别是i)肽的组(其中该肽不相互连接),优选序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2或其变体的肽,如本文所定义,ii)允许表达此类不相互连接的肽的组的核酸或核酸的组,iii)包含本文定义的核酸的组的表达盒或表达盒的组,iv)允许表达不相互连接的肽的组的一个载体或载体的组,v)允许表达不相互连接的该肽的组的细胞或细胞的组,或vi)包含此类肽、核酸、表达盒、载体和/或细胞的根据本发明的组合物。

[0074] 术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”也指治疗疼痛(可能与任何损伤、病理或病症相关)的任何成功指标,包括任何客观或主观参数,例如减轻、缓解、减缓进展或严重程度、稳定、减轻疼痛症状,或使受试者可以忍受或更能忍受疼痛。术语“治疗”疼痛还包括增加疼痛耐受性和/或减少感知到的疼痛。在特定方面,本发明的方法、化合物和组合物用于增加疼痛耐受性和/或减少感知到的疼痛。本文使用的术语“疼痛耐受性”是指受试者在情绪和/或身体崩溃之前可以感知和承受的疼痛量。疼痛耐受性不同于疼痛阈值(产生疼痛所需的最小机械刺激)。本文中使用的“增加疼痛耐受性”通常是指与之前的状态相比,受试者可以产生更大的疼痛耐受性(即,感知到的疼痛更少)的情况,例如,在向受试者施用序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2或其变体或包含所述肽或变体的组合物的合适的肽之后。

[0075] 在本发明的上下文中,与受试者的疼痛相关的“预防(preventing)”或“预防(prevention)”是指至少降低了受试者获得(或容易获得)任何一种疼痛的可能性,在受试者暴露于本发明的产品之后,即应用或施用本发明的合适产品或产品组,特别是i)合适的肽的组(其中该肽不相互连接),优选序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2或其变体(通常是功能变体)的肽,如本文所定义,ii)允许表达此类不相互连接的肽的组的核酸或核酸的组,iii)包含本文定义的核酸的组的表达盒或表达盒的组,iv)允许表达不相互连接的肽的组的一个载体或载体的组,v)允许表达不相互连接的肽的组的细胞或细胞的组,或vi)表达包含此类肽、核酸、表达盒、载体和/或细胞的根据本发明的组合物。例如,“预防”包括使可能接触或易受疼痛影响但尚未经历或显示疼痛症状的受试者不出现至少一种疼痛临床症状。

[0076] 在本发明的上下文中,“受试者”或“患者”是指动物,特别是需要治疗疾病或病症或其症状的哺乳动物。受试者可以是已被诊断为患有疾病或病症、或被确定为处于罹患疾病或病症的风险中的受试者,所述疾病或病症已知会导致受试者感到疼痛。在具体实例中,受试者被诊断或患有疼痛,例如急性疼痛和/或亚急性疼痛或慢性疼痛,包括神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏和/或痛觉超敏。

[0077] 在特定方面,受试者是人。

[0078] 在另一个特定的方面,受试者是动物,特别是家养动物或繁殖动物,特别是马、狗、猫、牛等。

[0079] 在另一个特定方面,受试者在myo1A基因中具有至少一个突变等位基因。

[0080] 肽

[0081] 本发明人在此鉴定了新型组分的组,特别是肽的组(其中所述肽彼此不连接),其当同时或依次组合使用时,可以预防或治疗疼痛,优选同时使用,特别是可以在受伤或发炎的神经系统的情况下逆转机械超敏反应。不受任何理论的约束,发明人认为,通过调节脊髓网络的兴奋性,这些肽表现出止痛或镇痛活性,特别是通过专门针对机械和/或化学诱导的

伤害感受信号表现出止痛活性。

[0082] 本文描述的肽是由来自人TAFA-4成熟蛋白(SEQ ID NO 5:SQHLRGHAGHHQIKQGTCEVVAVHRCCNKNRIEERSQTVKCSCFPGQVA GTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNK VKTTKVTR)的105个氨基酸残基的特定片段组成的(由信号序列的切割产生,并在公共数据库中识别,如Tang等人,2004年所公开的登记号#NP_0011005527或Genbank登记号AAP92409)。

[0083] 本发明人在此特别首次描述了产品/组分的组,特别是分离的或合成的肽的组,其包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:i)第一肽,其为SEQ ID NO:1(CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW,即,Cys-Phe-Pro-Gly-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Thr-Arg-Ala-Gln-Pro-Ser-Cys-Val-Glu-Ala-Ser-Ile-Val-Ile-Gln-Lys-Trp-Trp)或与SEQ ID NO:1具有至少90%一性的肽(在此被称为序列SEQ ID NO:1的"变体"、"肽变体"或"肽的变体"),和ii)第二肽,其为SEQ ID NO:2(CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR,即,Cys-His-Met-Asn-Pro-Cys-Leu-Glu-Gly-Glu-Asp-Cys-Lys-Val-Leu-Pro-Asp-Tyr-Ser-Gly-Trp-Ser-Cys-Ser-Ser-Gly-Asn-Lys-Val-Lys-Thr-Thr-Lys-Val-Thr-Arg)或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽(在此被称为序列SEQ ID NO:2的"变体"、"肽变体"或"肽的变体"),其中所述(至少两个)肽彼此不连接。

[0084] 与特定氨基酸/肽序列具有至少90%同一性的肽在本文中被称为具有所述序列的"变体"、"肽变体"或"肽的变体"。在优选的方面,存在于该组中或存在于包含/表达这种组的组合物中的任何变体是功能变体,如下文进一步解释的。

[0085] 术语"基本上由.....组成"具有通常赋予它们的含义,例如,它们允许未明确列举的要素,但排除在现有技术中发现的要素或影响本发明的基本或新颖特征的要素。因此,"基本上由特定序列组成"的肽的组是指包含该序列或由该序列(序列彼此不相连)组成的肽,并且其包括对于肽的活性非必需的其他特征。

[0086] SEQ ID NO:1的肽由人TAFA-4成熟蛋白的27个C端氨基酸残基组成,并且可以被鉴定为UniProt登记号#Q96LR4的氨基酸78-104。

[0087] SEQ ID NO:2的肽由人TAFA-4成熟蛋白的36个C端氨基酸残基组成,并且可以被鉴定为UniProt登记号#Q96LR4的氨基酸105-140。

[0088] 在特定的方面,SEQ ID NO:1的肽和/或SEQ ID NO:2的肽在N端位置被乙酰化和/在C端位置被酰胺化。

[0089] 在SEQ ID NO:1:CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW中的位置13处以粗体显示的两个氨基酸残基Q(Glu),和在SEQ ID NO:2:CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR中的位置18处以粗体显示的Y(Tyr)(参考分别在SEQ ID NO 1和SEQ ID NO 2中列出的位置),发明人认为这与肽的生物活性有关。

[0090] SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的变体也是发明人首次在此公开的。变体是指衍生自SEQ ID NO:1的肽或衍生自SEQ ID NO:2的肽的肽,并且是由于在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的所述肽中的一个或多个位点处缺失或添加一个或多个氨基酸和/或替换一个或多个氨基酸而产生的。如果变体基本上保留了SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的肽的功能活性,或者甚至改善了所述功能活性以允许预防或治疗疼痛,则该变体将被视为功能变体。可以使用功能测定(例如实验部分中进行的行为测定)来测量活性。

[0091] 在本发明的背景下可用的肽变体可以与编码所述肽的序列(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)具有如上所述至少90％,例如(至少)90.5％、91％、92％、92.1％、93％、93.7％、94％、95％、95.2％、96％、96.8％、97％、98％、98.4％或99％的序列同一性。

[0092] 在特定得方面,与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的变体调节脊髓中间神经元(优选脊髓lamina IIi中间神经元)的兴奋性。在优选的方面,变体是包含一个或多个点突变(例如2、3、4、5或6个点突变)的肽,该点突变添加、缺失或替换如本文所述的感兴趣的肽序列(例如特别是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)中存在的任何氨基酸。

[0093] 具体对于与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的肽变体,上一段适用,但前提是SEQ ID NO:1中位置13的氨基酸残基Q在与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的肽的氨基酸序列中保持不变,并且前提是SEQ ID NO:2中位置18的氨基酸残基Y在与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的肽的氨基酸序列中保持不变或者被丝氨酸(S)取代(位置13和18分别参考SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中所示的位置)。位置18处具有氨基酸残基S的肽为SEQ ID NO:6(CHMNPCLEGEDCKVLPDSSGWSCSSGNKVKTTKVTR,即,Cys-His-Met-Asn-Pro-Cys-Leu-Glu-Gly-Glu-Asp-Cys-Lys-Val-Leu-Pro-Asp-Ser-Ser-Gly-Trp-Ser-Cys-Ser-Ser-Gly-Asn-Lys-Val-Lys-Thr-Thr-Lys-Val-Thr-Arg)。

[0094] 因此,在本发明的优选方面中,SEQ ID NO:1的肽中位置13处的氨基酸Q(谷氨酰胺残基)(/参考SEQ ID NO:1中所示的位置)在与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的肽的变体的氨基酸序列中保持不变。相似地,在另一个优选的方面中,SEQ ID NO:2的肽中位置18处的氨基酸Y(酪氨酸残基)(/参考SEQ ID NO:2中所示的位置)在与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的肽的变体的氨基酸序列中也保持不变或被(丝氨酸)取代。

[0095] 在本发明的另一个优选的方面中,位置13的氨基酸Q(参考SEQ ID NO:1)在与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的肽的变体的氨基酸序列中保持不变,并且位置18的氨基酸Y(参考SEQ ID NO:2)在与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的肽的变体的氨基酸序列中也保持不变或者被丝氨酸(S)取代。

[0096] 在另一个特定的方面,可用于本发明上下文中的SEQ ID NO:1的肽的变体可与SEQ ID NO:1的肽序列具有至少88.8％、92.5％、96.2％序列同一性,优选具有上文关于参考SEQ ID NO:1在位置13处的氨基酸残基Q所述的条件。在另一个特定的方面,可用于本发明上下文中的SEQ ID NO:2的肽的变体可与SEQ ID NO:2的肽序列具有至少91.6％、94.4％、97.2％的序列同一性,优选具有上文关于参考SEQ ID NO:2的位置18处的氨基酸残基Y所述的条件。优选地,所述变体调节脊髓中间神经元(优选脊髓lamina IIi中间神经元)的兴奋性。

[0097] 在特定的方面,变体是包含一个或多个点突变(例如1、2或3个点突变)的肽,该点突变添加、缺失或替换如本文所述的感兴趣的肽序列(例如特别是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)中存在的任何氨基酸,优选具有上文关于参考SEQ ID NO:1的位置13处的氨基酸残基Q和参考SEQ ID NO:2的位置18处的氨基酸残基Y所述的条件。

[0098] 在特定的方面,一个或多个缺失位于感兴趣的序列(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)的N端。在另一个的方面,一个或多个缺失在C端,或在感兴趣的序列(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)的任何其他位置,上文关于SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所描述的限制条件是,涉及参考SEQ ID NO:1的位置13的氨基酸残基Q,以及参考SEQ ID NO:2的位置18的氨

基酸残基Y。在又一方面,两个或更多个缺失位于感兴趣的序列(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)的N端和C端。例如,在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的肽的N和/或C端或其核心处的此类缺失可以产生SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的截短的人肽变体。

[0099] 此外,根据本发明的肽的组中的任何肽可以与另一肽或蛋白质融合以形成可用于本文所述方法的缀合物,只要所述"另一肽或蛋白质"不是本发明的组中的"至少两种"肽之一。实际上,本文所述肽的组的肽(该组的活性成分)不应彼此连接。本文中的术语"缀合物"是指将两个分子的生物学功能结合在单个多肽内的工程融合构建体,特别是SEQ ID NO:1或2的肽或其变体,例如能够调节伤害感受器或中间神经元的兴奋性,以及例如与靶细胞特异性相互作用或结合的多肽。

[0100] 本发明还涉及编码本发明的组中的肽的核酸,例如序列SEQ ID NO:1的肽、序列SEQ ID NO:2的肽或本文所述的其变体。例如,本发明涵盖编码SEQ ID NO:1的肽或SEQ ID NO:2的肽或其变体的任何序列,以及由遗传密码简并而产生的相似序列。在特定的方面,编码本文所述的肽的核酸包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:SEQ ID NO 3:TGCTTC CCGGGACAGGTGGCGGGCACAACTCGGGCTCAACCTTCTTGT GTTGAAGCTTCCATTGTGATTCAGAAATGGTGG或SEQ ID NO 4:TGTCACATGAATCCGTGTTTGGAAGGAGAGGATTGTAAAGTGCTGCCA GATTACTCAGGTT GGTCCTGTAGCAGTGGCAATAAAGTCAAAACTACG AAGGTAACGCGG的序列。

[0101] 发明人在此特别描述了核酸分子的组,其包含允许表达彼此不连接的(至少两种)肽,其中(第一)核酸包含编码感兴趣的(第一)肽(例如SEQ ID NO:1的肽)或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽,并且(第二)核酸包含编码感兴趣的(第二)肽(例如SEQ ID NO:2的肽)或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽。发明人在本文中还描述了包含此类核酸的组的组合物,优选与本文所述的可接受的支持物、载剂、赋形剂或媒介物一起。

[0102] 编码SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或其变体的肽的上述核酸序列可与调节序列相邻,以控制其在适当的宿主细胞中的表达。

[0103] 在另一方面,本发明还涉及表达盒,其从5'至3'按以下顺序包含:

[0104] -启动子,

[0105] -编码感兴趣的肽(例如本文所述的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或其变体)的核酸序列;和

[0106] -终止信号,例如多聚腺苷酸化信号。

[0107] 编码感兴趣的肽的上述核酸序列或本文公开的表达盒的两侧可以有适合于将其包装到载体中的序列,该载体优化其在细胞中的转录和/或翻译。

[0108] 在另一方面,本发明还涉及允许表达本文所述肽或肽的组的载体。本发明还涉及载体,其包含允许表达(至少两种)彼此不连接的肽的核酸的组,或如本文所定义的表达盒的组。

[0109] 在进一步的方面,本发明人涉及了允许表达彼此不连接的(至少两种肽)的载体的组,其中(第一)载体包含编码感兴趣的(第一)肽(例如SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽)的序列,并且(第二)载体包含编码感兴趣的另一个(第二)肽(例如SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽)的序列。发明人在本文中还描述了包含此类载体的组的组合物,优选与本文所述的可接受的支持物、载剂、赋形剂或媒介物一起。

[0110] 产生该肽的方法

[0111] 为了允许在宿主细胞中表达,编码本文所述一个或多个肽(或其变体)的核酸可以存在于一个或多个载体中,并且在将所述载体引入合适的宿主细胞后,可以根据本领域公知的标准克隆和表达技术表达该序列以产生本文所述的编码肽(例如,如Sambrook,J.,Fritsh,E.F.,and Maniatis,T.Molecular Cloning:ALaboratory Manual 2nd,ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989中所述)。可以采用各种表达载体来表达编码本文所述肽的多核苷酸序列。可用于本发明的表达载体不完全包括真核表达载体,特别是哺乳动物表达载体、基于病毒的表达载体、杆状病毒表达载体、植物表达载体和任何质粒表达载体,以便在宿主细胞中产生任一种本文所述的肽。表达载体也可以是允许在细菌系统中表达肽的载体。当单个核酸编码几种肽或单个载体允许表达几种肽时,所得肽彼此不连接。

[0112] 表达载体的选择取决于其中载体将被表达的预期宿主细胞。本领域技术人员可以轻松做出这一选择。本发明还涉及包含编码本文所述肽的核酸序列的细胞,特别是宿主细胞。本发明人还首次公开了利用本文所述的载体修饰的(宿主)细胞。

[0113] 本文特别公开了允许表达彼此不连接的(至少两个)如本文所述的肽(或其变体)的细胞。该细胞通常包含编码感兴趣的肽(例如为SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽)的(第一)核酸序列或载体,,以及编码(第二/不同的)感兴趣的肽(例如SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽)的(第二)核酸序列或载体。还公开了包含此类细胞的组合物,优选与本文所述的可接受的支持物、载剂、赋形剂或媒介物一起。

[0114] 本文特别公开了允许表达彼此不连接的(至少两个)如本文所述的肽(或其变体)的细胞的组。每个细胞通常包含编码感兴趣的肽的核酸序列或载体,感兴趣的肽例如为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的肽,或与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽。还公开了包含此类细胞的组合物,优选与本文所述的可接受的支持物、载剂、赋形剂或媒介物一起。

[0115] 可以在原核或真核宿主细胞中表达本发明的肽或其变体。代表性宿主细胞包括许多大肠杆菌菌株、哺乳动物细胞系,例如CHO、CHO-K1和HEK293;昆虫细胞,例如Sf9细胞;以及酵母细胞,例如酿酒酵母和巴斯德毕赤酵母。

[0116] 本文所述的核酸或载体可通过通常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞的标准技术转染到宿主细胞中,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。或者,本文所述的核酸或载体可通过使用基于病毒的载体的转导递送到宿主细胞中。

[0117] 纯度可以通过任何适当的标准方法测量,例如通过柱色谱法、薄层色谱法或高效液相色谱(HPLC)分析。“分离”或“合成”肽还定义了对人受试者安全施用的无菌程度,例如,没有传染性或毒性剂。

[0118] 本文描述的组合物和方法中使用的肽也可以通过固相合成技术生产。肽的直接化学合成可以通过本领域技术人员熟知的方法来完成,例如天然化学连接(NCL)。该化学方法由未保护的肽片段的偶联组成:N端半胱氨酸的肽与C端硫酯肽发生反应。该转硫酯化反应之后迅速发生分子内S,N-酰基转移,导致在连接位点形成天然酰胺键。

[0119] 基因治疗

[0120] 通过将编码本文所述肽的核酸序列克隆到适当的载体中,本发明人还提供了新的基因传递工具,特别是用于疼痛,特别是急性、亚急性或慢性疼痛,优选慢性疼痛的基因治疗的遗传构建体(例如表达盒或载体)。可以采用基因治疗以允许受试者中的特定细胞内源性生产TAFA-4-肽或其变体。基因治疗可以在体内或体外进行。体外基因治疗需要分离和纯化至少受试者的细胞样品,将编码本文所述的肽的组的至少一个核酸序列(即转基因)引入分离的细胞,并将遗传改变/修饰的细胞重新引入受试者体内。相反,在体内基因治疗中,转基因通常被包装起来施用于受试者。基因传递构建体可以是非病毒的,也可以是病毒的。优选地,本文描述的遗传构建体用病毒元件、病毒载体和/或任何病毒包装系统制备,该病毒包装系统可用于在靶标组织/细胞中表达转基因/编码序列(即编码感兴趣的肽的组或其变体的核酸序列)。病毒载体可以掺入任何合适的启动子和其他转录调节子,以允许或促进转基因产物在靶标组织/细胞中的表达。病毒包装系统最好适应靶标细胞。一旦进入靶标细胞,该系统就会促进向靶标组织的递送。在本文所述方法中可用的病毒载体优选为复制缺陷型病毒,如例如腺病毒或腺相关病毒(AAV)载体。

[0121] 在一些方面,本发明涉及重组腺相关病毒(AAV),其在基因组中包含编码感兴趣的组中的至少一种肽,优选至少两种肽,例如SEQ ID NO:1的肽和/或SEQ ID NO:2的肽,或其变体的核酸序列。核酸的编码部分通常与启动子可操作地连接。

[0122] 迄今为止,已经从人或非人灵长类动物(NHP)中分离出至少几十种具有不同表面特性的不同的AAV血清型并进行了表征。术语“血清型”允许技术人员区分具有血清学上不同衣壳的AAV。血清学特异性是根据一种AAV血清型的抗体与其他AAV血清型相比缺乏交叉反应性来确定的。本文描述的rAAV,也称为rAAV载体或rAAV颗粒,可以具有以下已知血清型中的任一种,即可以选自例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV.rh8、AAV.rhIO、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、AAV.7m8、AAV.PHP.B、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16和AAVhu68。rAAV载体可能对特定细胞、组织或器官具有增强的向性。在通过口服途径施用的情况下,rAAV载体可能对胃、小肠或结肠组织具有增强的向性,更具体地说,对构成这些组织的细胞,特别是上皮细胞,例如肠细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞、潘氏细胞或簇细胞。对于位于肠道内的靶细胞或递送到肠道的靶细胞,可以选择AAV4、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10中的任何一个作为特别有效的。

[0123] 本发明的基因治疗载体或盒可以通过本领域技术人员熟知的和先前描述于例如PCT专利申请公开号WO03042397和美国专利号6,632,670中的方法产生。

[0124] 本说明书还涉及生产重组载体(例如病毒载体如AAV)的方法,包括:

[0125] a)培养已用本文所述重组载体转染/转导的细胞;以及

[0126] b)从转染/转导细胞的上清液中回收重组载体。

[0127] 本发明的基因治疗载体可以通过将两个或三个质粒转染到293或293T人胚肾细胞系中产生。在特定的方面,编码治疗肽的DNA由一个质粒提供;由一种或多种血清型的AAV产生的衣壳蛋白和复制基因、以及例如由腺病毒产生的辅助功能均由第二个质粒反式提供。在另一特定的方面,编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2或其变体的肽的DNA由一个质粒提供;

由一种或多种血清型的AAV产生的衣壳蛋白和复制基因由第二个质粒反式提供,并且例如由腺病毒产生的辅助功能由第三个质粒提供。在特定的方面,第一质粒包含表达盒,该表达盒包含编码本文所述的SEQ ID NO:1的肽和SEQ ID NO:2的肽或其变体的核酸序列,该核酸序列可操作地连接至启动子,包括两个侧翼倒置末端重复序列(ITR)。在另一个特定的方面,编码每种治疗性肽的DNA经由两种不同的质粒提供,第一质粒包含编码SEQ ID NO:1的肽或其变体的核酸序列,第二质粒包含编码SEQ ID NO:2的肽或其变体的核酸序列。

[0128] 在细胞培养之后,基因治疗载体可以例如通过冻融循环从细胞中释放出来,并通过本领域技术人员熟知的任何方法纯化,例如通过使用碘克沙醇分级梯度,然后在Hi-Trap QHP柱上进行离子交换色谱。然后,可以通过旋转柱浓缩所得的基因治疗载体,并且可以将纯化的载体冷冻保存(在-60℃或以下),例如在磷酸盐缓冲盐水中。

[0129] 本发明的相关方面包括用至少一种重组载体转染或转导的宿主细胞,例如用至少一种本文所述的AAV载体转导的宿主细胞;或用包含编码本文定义的治疗肽或其变体的DNA的载体或载体组转染的细胞的组。本发明的进一步相关方面包括包含本文所述的重组载体(例如AAV)的基因组或(基本)由其组成的任何核酸分子。

[0130] 组合物

[0131] 本文所述的组合物包含(至少两种)如本文所述彼此不连接的肽的组,或本文所述的允许表达所述(至少两种)肽的产品(例如核酸、细胞、核酸的组或细胞的组),可以是药物性、治疗性、预防性或兽医性组合物。组合物也可以是(可能同时)饮食性/膳食性组合物。

[0132] 本文所述的特定组合物包含序列SEQ ID NO:1的肽或其(典型的功能)变体(即,与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽),和序列SEQ ID NO:2的肽或其(典型的功能)变体(即,与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽),其中所述(至少两个)肽彼此不连接。

[0133] 本文描述的两个或多个肽的组被有利地配制,以便肽可以单独或同时组合使用。因此,该组中的每个肽可以以单独的形式或以包含该组中至少两种肽的混合物的组合物的形式制备。该组合物可以是饮食性(dietary)/膳食性(dietetical)组合物或药物组合物,并且可以用于本文所述的治疗或预防方法。

[0134] 在特定的方面,本发明涉及组合物,其包含:如本文所述的至少两种彼此不连接的肽或其变体,通常是(至少两个)彼此不连接的肽的组、编码(至少两个)彼此不连接的肽的核酸或核酸的组、允许表达(至少两个)彼此不连接的肽的表达盒或表达盒的组、允许表达(至少两个)彼此不连接的肽的载体或载体的组,或允许表达(至少两个)彼此不连接的肽的细胞或细胞的组,并且优选包含如本文所述的可接受的支持物、载剂、赋形剂或媒介物,特别是饮食上和/或药学上可接受的支持物、载剂、赋形剂或媒介物。

[0135] 术语“饮食上可接受的支持物”涉及载剂,该载剂允许受试者无风险地摄取和消化包含本文所述的肽或肽的组、核酸序列或核酸序列的组、表达盒或表达盒的组、载体或载体的组、或细胞或细胞的组的组合物,并且能够保护所述肽免受任何攻击,特别是与食物消化相关的攻击,这些攻击可能会在肽根据疼痛的性质和定位在正确的位点和正确的时间产生治疗作用之前改变肽。

[0136] 在其中组合物包含两种肽的特定方面,第一肽和第二肽可以以相等或不同的比例存在于本发明的组合物中。在特定的组合物中,第一肽和第二肽以相等(等摩尔)比例存在于组合物中,即,每种肽代表组合物的肽组分的50%,这意味着组合物含有相同摩尔量的两

种肽中的每一种。

[0137] 另一种特定的肽组合物可包含相对于另一种肽或其它肽更大比例的一种特定肽或多种特定肽。例如,特定肽可表示组合物肽组分的至少1%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。

[0138] 在口服施用的情况下,该组合物还可以包含至少一种胃肠道保护剂,优选酸抑制剂,其存在量可有效将受试者的胃部pH值升高到至少2、至少3、至少4,和更优选到至少5或6。术语"酸抑制剂"是指抑制胃酸分泌并增加胃液pH值的药物。酸抑制剂可以包括但不限于H_2封闭剂,包括西咪替丁、雷尼替丁、乙溴替丁、帕布替丁、拉呋替丁、洛替丁、法莫替丁;质子泵抑制剂,包括奥美拉唑、埃索美拉唑、泮托拉唑、兰索拉唑、右兰索拉唑、雷贝拉唑、帕利拉唑、来明拉唑和泰妥拉唑;或其任意组合。

[0139] "药学上可接受的支持物/媒介物/载剂"可以是与活性剂(即,本发明的至少两种肽或其变体以及任选的任何另外的不同的活性剂)一起施用的稀释剂、佐剂或赋形剂。这样的药物载剂可以是无菌液体,例如水或油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时,水是优选的载剂。盐溶液、水葡萄糖和甘油水溶液也可用作液体载剂,特别是对于注射溶液。合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0140] 药学上可接受的支持物/媒介物/载剂可以由抗坏血酸和/或抗坏血酸盐组成或包含抗坏血酸和/或抗坏血酸盐。抗坏血酸盐的示例是抗坏血酸镁、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙和抗坏血酸棕榈酸酯。

[0141] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含抗坏血酸或抗坏血酸盐。

[0142] 当该组合物,例如药物组合物,用于口服施用时,片剂或胶囊可通过常规方法用药学上可接受的赋形剂制备,例如粘合剂(例如,预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如,乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石粉或二氧化硅);崩解剂(例如,马铃薯淀粉或淀粉甘醇酸钠);或润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠)。可以用本领域中熟知的任何方法对片剂进行包衣。用于口服施用的液体制剂可以采用例如溶液、糖浆或混悬剂的形式,或者它们可以作为干燥产品存在,在使用前用水或其他合适的媒介物重构。这种液体制剂可以通过常规方法用药学上可接受的添加剂制备,例如悬浮剂(例如山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯胶);非水媒介物(例如杏仁油、油性酯、乙醇或分馏植物油);和防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或山梨酸)。该制剂还可根据情况含有缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。

[0143] 本发明的组合物,例如药物、预防或治疗组合物,可以进一步包含至少一种另外的(不同的)活性化合物。优选地,另外的活性化合物是有效对抗疼痛的活性剂。"有效对抗疼痛"是指活性剂具有镇痛或止痛特性(受试者可测量地感觉到)。更优选地,另外的活性化合物是甾体抗炎药(SAID)、非甾体抗炎药(NSAID)或阿片类药物。

[0144] SAID可包括但不限于氢化可的松、可的松、乙塞米松、泼尼松、泼尼松龙、去炎松、地塞米松、氟氢可的松或其任意组合。

[0145] NSAID可包括但不限于塞来昔布、罗非昔布、罗美昔布、伐地考昔、帕瑞考昔、依托

考昔、CS-502、JTE-522、L-745,337、NS398、阿司匹林、对乙酰氨基酚(就本公开的目的被视为NSAID)、布洛芬、氟比洛芬、酮洛芬、萘普生、奥沙普秦、依托度酸、吲哚美辛、酮咯酸、氯诺昔康、美洛昔康、吡罗昔康、屈昔康、替诺昔康、萘丁美酮、双氯芬酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、二氟尼柳、舒林酸、托美丁、非诺洛芬、舒洛芬、苯恶洛芬、醋氯芬酸、托芬那酸、羟基保泰松,阿扎丙宗、苯基丁氮酮或其任意组合。

[0146] 阿片类药物可以包括但不限于(右)丙氧芬、A-甲基芬太尼、阿芬太尼、烯丙罗定、贝齐米特、丁丙诺啡、布托啡诺、卡芬太尼、去甲罗定、右吗拉胺、地佐辛、二乙酰吗啡、二氢可待因酮、二氢埃托啡、二吗啡酮、地芬诺酯、地匹哌酮、埃托啡、芬太尼、酮贝米酮、利非他明、左乙酰美沙朵、左美沙芬、左吗啡诺、洛哌丁胺、哌替啶、美普他酚、美沙酮、甲基吗啡、吗啡、纳布啡、尼可吗啡、奥美芬太尼、奥利帕文、羟可酮、羟吗啡酮、PEPAP、对吗啡、喷他佐辛、非那佐辛、哌啶胺、罗定、瑞芬太尼、舒芬太尼、他喷他多、替利定、曲马多,或阿片类拮抗剂如纳美芬、纳洛酮、纳曲酮或其任意组合。

[0147] 治疗和预防用途

[0148] 本说明书公开了肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其组或其任意组合,以及包含这种肽、核酸、表达盒、载体、细胞和/或其组的组合物,如上所述,其用作活性预防或治疗成分,优选用作药物组合物、药物或药品。

[0149] 在特定的方面,肽,特别是SEQ ID NO:1的分离的或合成的肽和/或SEQ ID NO:2的分离的或合成的肽,优选所述肽的组,允许表达此类肽的任何组,或包含本文所述的此类肽、核酸、表达盒、载体、细胞和/或组的任何组合物,用作药物组合物、药物或药品,特别是用于预防或治疗疼痛。

[0150] 在另一方面,本说明书涉及如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体或细胞和/或如本文所述的组,其用作用于预防或治疗有此需要的受试者的疼痛的活性成分/药剂。

[0151] 本说明书特别涉及本文公开的产品或任何本文公开的产品的组,例如本文所述的细胞的组,通常涉及肽的组或包含或表达此类肽的组的细胞,其用于[作为活性成分]用于预防或治疗有此需要的受试者的疼痛。

[0152] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组或如本文所述的其任何组合,用于制备用于预防或治疗有此需要的受试者的疼痛的药物组合物、药物或药品中的用途。本文还描述了用于预防或治疗疼痛的相应方法,所述方法通常包括向有此需要的受试者施用本文所述的所述肽、核酸、表达盒、载体、细胞、组和/或组合物的步骤。

[0153] 本说明书特别提供了预防或治疗有此需要的受试者的疼痛的方法,其包括施用(治疗)有效量的如本文所述的产品,例如特别是如本文所述的组和/或组合物的步骤,优选包含以下的肽的组:SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的其变体,和SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的其变体,或包含此类组的组合物。

[0154] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组或其任何组合或如本文所述的组合物,用于预防或治疗疼痛,特别是急性、亚急性或慢性疼痛,优选慢性疼痛的用途。

[0155] 优选地,疼痛是神经病理性疼痛(例如化疗引起的外周神经病理性疼痛或化疗引

起的神经病理性疼痛)、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏或痛觉超敏。

[0156] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞和/或其本文所述的组,或其任何组合或本文所述的组合物,用于预防或治疗神经病理性疼痛(如化疗引起的周围神经病理性疼痛或化疗引起的神经病理性疼痛)、术后疼痛或炎症性疼痛的用途。

[0157] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组,或本文所述的其任何组合物,用于预防或治疗慢性神经病理性疼痛(如慢性化疗引起的周围神经病理性疼痛或慢性化疗引起的神经病理性疼痛)、慢性术后疼痛或慢性炎症性疼痛的用途。

[0158] 在更特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组,或本文所述的其任何组合物,用于预防或治疗骨关节炎疼痛的用途。

[0159] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组,或如本文所述的其任何组合物,用于预防或治疗痛觉过敏,特别是热的(如热或冷的痛觉过敏,优选冷的痛觉过敏)或机械性痛觉过敏,优选机械性痛觉过敏,甚至更优选损伤引起的机械性痛觉过敏的用途。

[0160] 在另一特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组,或本文所述的其任何组合物,用于预防或治疗痛觉超敏,特别是机械性痛觉超敏的用途。优选地,所述机械性痛觉超敏为神经损伤引起的机械性痛觉超敏或静态型的机械性痛觉超敏。

[0161] 在进一步的特定的方面,发明人在本文中描述了本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组,或本文所述的其任何组合物,用于预防或治疗痛觉超敏、特别是热痛觉超敏、例如热痛觉超敏(即,对通常无痛的温暖刺激感知到的疼痛)或冷痛觉超敏(即,对通常无痛的冷刺激感知到的疼痛),优选冷痛觉超敏的用途。

[0162] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组,或如本文所述的其任何组合物,用于预防或治疗机械超敏反应(也称为对机械刺激过敏或简称痛觉过敏),优选损伤引起的机械超敏反应的用途。

[0163] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的本发明的任何产品,例如如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组,或本文所述的其任何组合物,用于预防或治疗因晒伤引起的疼痛或因冰烧伤引起的疼痛。

[0164] 治疗可改善触觉、灼热感或寒冷感、针刺感、麻木感、瘙痒感、剧烈疼痛和难以正确感知温度等一种或多种感觉。在特定方面,该治疗可消除疼痛。在另一个特定方面,该治疗减轻了疼痛的症状,特别是神经病理性疼痛(痛觉超敏和/或痛觉过敏)的症状。本发明的方法即使不能消除神经病理性疼痛,也能使神经病理性疼痛更易于控制(即改善生活质量)。

[0165] 可以使用本领域技术人员熟知的标准测试来评估疼痛,特别是(慢性)神经病理性疼痛是否已经使用本发明的特定肽进行了治疗。例如,已使用定量感觉测试(针刺试验、压力痛觉计、von Frey测痛实验、触觉、捏或用手指轻压)或使用疼痛评定量表对受试者的疼

痛敏感度的评估进行了标准化。

[0166] 受试者

[0167] 在本发明的上下文中,受试者或患者是动物,优选哺乳动物。在特定方面,受试者是家养动物,例如马、狗、猫、牛等。在另一特定的且优选的方面,受试者是人类。

[0168] 患有源自神经病理性疼痛的慢性疼痛的受试者可能患有典型与此类神经病理性疼痛相关的疾病,例如纤维肌痛、复杂性局部疼痛综合症、带状疱疹后神经痛、Ehlers-Danlos综合症和红斑性肢痛症。

[0169] 在特定方面,受试者患有纤维肌痛(FM)。纤维肌痛是以慢性肌肉骨骼疼痛为特征的综合症(Siracusa等人,2021)。FM是由中枢敏化现象引起的,其特征是神经回路功能障碍,涉及传入伤害性刺激的感知、传递和治疗,在运动系统层面普遍表现为疼痛。该疾病的主要症状是肌肉僵硬、关节僵硬、失眠、疲劳、情绪障碍、认知功能障碍、焦虑、抑郁、全身敏感以及无法进行正常的日常活动。FM还可能与特定疾病有关,例如感染、糖尿病、风湿病和/或精神或神经疾病。

[0170] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组(即,此类肽、核酸、表达盒、载体或细胞的组)或如本文所述的包含此类肽、核酸、表达盒、载体、细胞或组的组合物,用于预防或治疗纤维肌痛(FM)的用途。

[0171] 在另一方面,受试者患有复杂性局部疼痛综合征(CRPS)。复杂性局部疼痛综合症是涉及四肢的慢性神经性病症,其特征是剧烈疼痛,伴有感觉、自主神经、运动和营养障碍(Goh等人,2017)。该病症可能是由手术、创伤或轻伤引起的且具有不同的病程,从轻微和自限性,到慢性病,其影响日常生活活动和与健康相关的生活质量。CRPS可分为两种类型:CRPS类型I和II的特征是不存在或存在可识别的神经损伤。CRPS I型是通常在起始有害事件后发生的综合症,并不局限于单个外周神经的分布,并且与诱发事件不成比例。它与水肿、皮肤血流变化、疼痛区域的异常汗腺活动、痛觉超敏和痛觉过敏有关,并且通常涉及患肢的远端或具有远端到近端的梯度。CRPS II型可被定义为灼痛、痛觉超敏和痛觉过敏,其发生在神经或支配该区域的主要分支之一的局部损伤后的肢体区域。

[0172] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组(即,此类肽、核酸、表达盒、载体或细胞的组)或如本文所述的包含此类肽、核酸、表达盒、载体、细胞或组的组合物,用于预防或治疗复杂区域疼痛综合征(CRPS)的用途。

[0173] 在另一方面,受试者患有带状疱疹后神经痛(PHN)。带状疱疹后神经痛是带状疱疹(HZ)最常见的并发症,带状疱疹是由感觉神经节中休眠的水痘带状疱疹病毒的重新激活引起的感染(Ngo等人,2020)。其特征是局部起泡皮疹并伴随相关皮节疼痛。PHN被定义为在首次出现HZ皮疹后至少90天内持续的疼痛,并且它会显著降低受影响患者的生活质量。PHN细分为易激性伤害感受器模型和传入神经阻滞模型。在VZV重新激活期间,病毒会复制并从脊神经节扩散到其各自的外围环境。这种增殖会引起损伤外周神经的免疫应答和炎症。这种损伤会降低神经元对疼痛的抑制能力,从而降低疼痛信号去极化的阈值。这会导致对非疼痛刺激产生疼痛感知,这个过程称为外周敏化。C亚型伤害感受器的反复激活也会导致增强的背角兴奋状态。HZ造成的直接损伤会削弱下行抑制性疼痛通路,导致背角二级神经元的慢性激活。此外,据报道,与不患有PHN的HZ患者相比,患有PHN的HZ患者背角中缺失抑制性γ氨基丁酸(GABA)产生的中间神经元。这些因素在称为中枢敏化的过程中会放大传入输入

的所有后续反应。在PHN中,该过程伴随着低阈值机械感受性传入(称为Aβ纤维)的解剖重组,这些机械感受性传入通常将无害的触觉刺激传递到中枢神经系统。当病毒损伤导致外周C-伤害感受器丢失时,这些纤维会以补偿的方式与最初连接到C-伤害感受器传入的二级神经元连接。这一过程称为传入神经阻滞,患有痛觉超敏的患者会表现出严重的感觉功能丧失。

[0174] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组(即,此类肽、核酸、表达盒、载体或细胞的组)或如本文所述的包含此类肽、核酸、表达盒、载体、细胞或组的组合物,用于预防或治疗带状疱疹后神经痛(PHN)的用途。

[0175] 在另一方面,受试者患有红斑性肢痛症(EM)。红斑性肢痛症是罕见的发作性肢端综合症,主要影响双侧对称性或单侧下肢,具有红斑、温热和灼痛的经典三联症(Maria Bibiana Leroux,2018)。EM与慢性疼痛综合症归为一类。原发性EM是常染色体显性遗传疾病,由OMIN(人类在线孟德尔遗传)编码为#133020。它与9型钠通道(SCN9A)的α亚基蛋白的改变有关,影响主要在背根神经节和交感神经节神经元中表达的Nav1.7通道。继发性EM与骨髓增殖性疾病、副肿瘤、自身免疫性疾病、接触毒素和感染有关。

[0176] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组(即,此类肽、核酸、表达盒、载体或细胞的组)或如本文所述的包含此类肽、核酸、表达盒、载体、细胞或组的组合物,用于预防或治疗红斑性肢痛症(EM)的用途。

[0177] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组(即,此类肽、核酸、表达盒、载体或细胞的组)或如本文所述的包含此类肽、核酸、表达盒、载体、细胞或组的组合物,用于预防或治疗其中由伤害感受器或中间神经元传递的信号受损的任何与疼痛相关的病症的用途。

[0178] 发明人先前确定,当与表达功能性Myo1a的Myo1a$^{+/+}$参考受试者中观察到的表达相比时,受试者中肌球蛋白IA(Myo1a)的缺失、表达减少或不足或无功能性表达使受试者易于发生损伤引起的慢性机械性疼痛和/或炎症引起的慢性热痛(WO2017153424)。

[0179] 在另一方面,受试者是具有myo1A基因中一个或两个突变的等位基因的受试者。“突变”等位基因是指改变Myo1a的表达或表达水平的myo1A基因核酸(在编码或非编码区)的替换、缺失或插入。突变可以影响一个或多个核碱基。该替换可以是单核苷酸多态性(SNP)。

[0180] 在特定的方面,发明人在本文中描述了如本文所述的肽、核酸、表达盒、载体、细胞及其相应的组(即,此类肽、核酸、表达盒、载体或细胞的组)或如本文所述的包含此类肽、核酸、表达盒、载体、细胞或组的组合物,用于预防或治疗此类受试者的损伤引起的慢性机械性疼痛和/或炎症引起的慢性热痛的用途。

[0181] 剂量

[0182] 根据本发明的产品,特别是肽、肽的组或包含此类组或允许其表达的组合物,优选以治疗有效量直接施用于受试者。术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防受试者的疼痛所需的感兴趣的肽的量,特别是SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2或其功能变体的肽。治疗有效量可在细胞培养试验或动物模型中初步估计。还可以使用动物模型来确定肽(肽的组)的适当浓度范围和施用途径。这些信息可以用来确定人体施用的有用剂量和途径。

[0183] 本文所述方法中使用的肽的剂量可能因受试者的一般健康状况、年龄、性别和体

重、疼痛的性质和严重程度/强度、施用的时间、频率和持续时间、所使用的特定肽、药物组合、反应敏感性和对治疗的耐受性/反应而异。该合适的有效剂量可以通过常规实验确定，并由临床医生判断。

[0184] 剂量可以以丸剂形式施用，也可以分成几部分(/单位)，在一天内分别施用。换句话说，治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。有效剂量可连续施用数天、数周、数月或数年。

[0185] 为了获得合适的止痛或镇痛效果，存在于发明人在此描述的肽的组中，或存在于包含此类肽的组(通常为SEQ ID NO:1的肽和SEQ ID NO:2的肽两者)的组合物中的肽或其变体的有效总剂量为每单位剂量1μg至10g，优选1μg至100mg，更优选25μg至10mg，甚至更优选2mg至10mg。

[0186] 在本发明的特定的方面，将该肽的组或包含此类肽的组的组合物以每24小时1μg/体重kg(即1μg/kg/天)至100mg/kg/天、优选2.5μg/kg/天至0.6mg/kg/天的剂量施用于哺乳动物。

[0187] 当受试者为人类时，施用于受试者的本发明人在此所述的肽或其变体的有效剂量(如果受试者是人受试者)优选在2.5μg/kg/天至0.6mg/kg/天之间，优选在5μg或10μg/kg/天至0.5mg/kg/天之间，更优选在50μg或75μg/kg/天至0.3mg/kg/天之间。

[0188] 在本发明的特定的方面，该肽的组或包含该肽的组的组合物以其中SEQ ID NO:1的肽和SEQ ID NO:2的肽处于等效摩尔浓度的剂量施用。

[0189] 在本发明的更特定的方面，该肽的组或包含此类肽的组的组合物以包含50μg/kg至150μg/kg的SEQ ID NO:1的肽和100μg/kg至250μg/kg的SEQ ID NO:2的肽的剂量施用。

[0190] 将如本文所述的产品，特别是如本文所述的肽或组合物递送至有此需要的受试者可通过任何途径实现。

[0191] 本文所述的产品可以例如肌肉内、静脉内、腹膜内、口服(经口)、肛门地、皮肤地、皮下地、局部地、真皮地、透皮地或鞘内地施用。优选地，将本文所述的产品皮下地、口服或静脉内，甚至更优选皮下地或口服施用。

[0192] 如实验部分所示，发明人证明了包含SEQ ID NO:1的肽和SEQ ID NO:2的肽的肽的组当皮下施用时具有镇痛效果，以治疗疼痛，特别是神经病理性疼痛。令人惊讶的是，当口服(经口)或静脉内施用包含SEQ ID NO:1的肽和SEQ ID NO:2的肽的肽的组时，也观察到镇痛效果。更令人惊奇和有利的是，本发明的肽的组当经口或皮下施用时，显示出比TAFA-4(全长)蛋白更好的镇痛效果，这使得它比所述全长蛋白更方便和适合施用于患者。

[0193] 有利地，本发明的两种肽的组或包含这种组的组合物，虽然比全长TAFA-4蛋白更容易产生(并且因此更便宜)，但当皮下施用时，与后者相比，其诱导更高的镇痛活性/效果。更令人惊奇的是，当口服(经口)施用时，本发明的肽的组与TAFA-4(全长)蛋白相比表现出更好的镇痛效果，这使得它比所述TAFA-4全长蛋白更方便和适合施用于患者。静脉内注射两种肽的组有利地提供了用于治疗神经病理性疼痛的第三施用途径。

[0194] 试剂盒

[0195] 本文所述的每种产品，例如本文所述的每种产品，优选本文所述的每种肽、每个肽的组或本文所述的每种组合物，可以是试剂盒的一部分。

[0196] 本发明的典型试剂盒包含至少两种本文所述的产品，其选自肽或其变体、核酸、表达盒、载体、细胞、肽的组、核酸的组、表达盒的组、载体的组、细胞的组和包含此类肽、核酸、

表达盒、载体、细胞或组的组合物,以及任选地至少一种另外的针对疼痛有效的不同活性的化合物。在特定的方面,该试剂盒进一步包含用于使用该试剂盒的书面说明。

[0197] 该试剂盒优选为包含至少两部分(例如两个不同的容器)的试剂盒套件,其中第一部分包含本文公开的肽、核酸、表达盒、载体、细胞、肽的组、核酸的组、表达盒的组、载体的组或细胞的组,或组合物,而第二部分包含至少一种另外的针对疼痛有效的不同活性的化合物。优选地,对抗疼痛有效的活性化合物是本文公开的甾体抗炎药(SAID)、非甾体抗炎药(NSAID)或阿片类药物。

[0198] 在特定的方面,该试剂盒包含i)第一肽或编码此类肽的核酸序列,第一肽为SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽,ii)第二肽或编码此类肽的核酸,第二肽为SEQ ID NO:2的第二肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽,所述第一肽和所述第二肽或编码所述肽的所述核酸在不同的容器中,和任选地,iii)至少一种另外的针对疼痛有效的不同活性的化合物,和/或iv)用于使用试剂盒的书面说明。

[0199] 在一个方面,试剂盒中的肽、核酸、表达盒、载体、细胞、组或组合物是适合于肌肉内、静脉内、腹膜内、口服(经口)、肛门、皮肤、皮下、局部、真皮、透皮或鞘内途径的形式,优选皮下或口服途径,甚至更优选口服途径。

[0200] 在另一方面,至少一种另外的对抗疼痛有效的不同活性化合物为适合于肌肉内、静脉内、腹膜内、口服(per os)、肛门、皮肤、皮下、局部、真皮、透皮或鞘内途径的形式。

[0201] 根据所要治疗的疼痛的性质、来源和强度,也根据肽、核酸、表达盒、载体、细胞、组或组合物的内容物的性质以及根据至少一种另外的对抗疼痛有效的不同活性化合物的性质,所述产品可以同时/伴随或顺序共同或不共同施用。

[0202] 本发明还涉及本发明的试剂盒在体内、离体或体外用于预防或治疗如上所述的疼痛(例如慢性疼痛、神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏或痛觉超敏)的用途。本发明的试剂盒还可用于预防或治疗急性或亚急性疼痛。

[0203] 本文还公开了本发明的试剂盒在制备用于预防或治疗有此需要的受试者的上述疼痛的药物组合物、药物或药品中的用途,例如慢性疼痛、神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏或痛觉超敏。本发明的试剂盒还可以用于制备用于预防或治疗有此需要的受试者的急性或亚急性疼痛的药物组合物、药物或药品。

[0204] 研究工具

[0205] 在特定方面,本发明的产品还可以用于研究背景中。

[0206] 本发明还包括本文所述的肽或其变体,特别是肽的组或本文上文所述的任何其它产品作为研究工具的用途。

[0207] 编码本文所述肽或其变体的核酸、允许其表达的表达盒或载体或包含此类核酸或使用此类表达盒或载体修饰的细胞通常用于在体外或离体表达或调节感兴趣的肽,特别是SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的其功能变体和/或SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的其功能变体的表达。

[0208] 这些工具可用于研究疼痛用于调节生物组织或细胞培养中的神经元兴奋性,例如研究机械和/或化学诱导的疼痛伤害性信号。

[0209] 本发明还涉及编码SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽和SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽的核酸,或允许其表达的表

达盒或载体的用途,以在生物组织或细胞培养物中表达或调节SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽和SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽的表达(水平)。

[0210] 本文描述的核酸分子也可用于产生转基因动物。这可以通过局部体细胞修饰或通过生殖系治疗使生殖细胞包含可遗传的修饰来实现。因此,本发明还涉及转基因生物(例如动物),其包含(即含有)SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4的核酸或其变体;包含SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4的核酸或其变体的表达盒或载体;或表达SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽和/或SEQ ID NO:2的肽或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的肽。因此,本发明还涉及宿主细胞或转基因生物体,特别是转基因动物,其含有编码本文所述的任何(至少两种)肽的组的核酸序列或允许其表达的表达盒或载体。

[0211] 提供下面的实施例是为了证明并进一步说明本发明的某些优选方面,但不应理解为限制本发明的范围。

实施例

[0212] 材料和方法

[0213] 多肽合成

[0214] 使用Fmoc-SPPS在Symphony X仪器(Protein Technologies,Inc.,美国)上以200μmol规模合成所有肽。合成级Fmoc-AA试剂购自Iris Biotech。特异性L-假脯氨酸二肽用于促进肽合成。HATU、2-氯三苯甲基氯树脂(200-400目,1.2mmol/g)、RINK酰胺树脂(200-400目,0.42mmol/g)购自IRIS Biotech。DMF、DCM、甲醇、乙醚和HPLC级乙腈购自Aldrich。每个残基的标准脱保护-偶联循环由六个步骤组成:

[0215] 1.用5mL DMF洗涤(3x 30sec)

[0216] 2.用5mL 20%哌啶的DMF脱保护Fmoc基团(3x 3分钟)

[0217] 3.用5mL DMF洗涤(3x 30sec)

[0218] 4.偶联Fmoc-AA(2x 60分钟)

[0219] a.将5ml Fmoc-AA以200mM溶解在DMF中

[0220] b.将2ml HATU以500mM溶解在NMP中

[0221] c.将2ml iPr_2NEt以1M溶解在NMP中

[0222] 5.用5mL 10% Ac_2O封盖在DMF中(7分钟)

[0223] 6.用5mL DMF洗涤(3x 30sec)

[0224] 合成完成后,肽树脂用DMF洗涤3次,用DCM洗涤3次。然后用三种TFA裂解混合物之一裂解肽树脂(每100μmol规模合成):

[0225] o 35mL TFA/1000μL TIS/2000μL水、1000mg DTT

[0226] 在TFA裂解3h后,从树脂中过滤裂解溶液,并通过添加到40mL冰冷的乙醚中沉淀肽。在-20℃下>1h后,以3500RCF离心乙醚溶液,并倾析上清液。将沉淀用乙醚再洗涤两次,然后在溶解、分析表征和纯化之前在真空干燥器中干燥>3h。

[0227] 制备肽树脂酰肼的一般方法

[0228] 将0.35mmol Fmoc-NH-NH_2溶解于30mLDCM中,然后向溶液中加入1.5mmol DIPEA。然后将该溶液加入到1g树脂中并在室温下混合2h。将未反应的基团用17:2:1DCM:MeOH:

DIPEA封盖30分钟。然后将Fmoc-AA-树脂用DMF洗涤3次,用DCM洗涤3次,并真空干燥>20分钟。通过滴定Fmoc基团脱保护(UV,301nm)来确定负载。

[0229] 分析和纯化

[0230] 通过UPLC和ESI-MS质谱分析肽。仪器配备有BEH C18(WATERS),150*2.1mm(150×2.1mm)(流速:0.6mL/分钟)。溶剂A和B是0.1% TFA的水溶液和0.1% TFA的乙腈溶液。

[0231] 使用反相柱(Vydac Denali prep C-18,10μm,120 Å,50×300mm)和缓冲液A中适当梯度的增加的浓度的缓冲液B(流速为80mL/分钟)用制备型反向HPLC(Waters Delta Prep 4000)对粗肽进行纯化。通过在214nm下的UV测量(Waters 2489UV/可见检测器)鉴定含有纯化的靶肽的级分,然后将选择的级分合并并冻干。

[0232] 合成Ac-CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW-$NHNH_2$(肽F1-SEQ ID NO:1):

[0233] 使用酰肼树脂,通过如上所述的标准Fmoc-SPPS制备肽F1(Ac-CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW-$NHNH_2$),随后采用标准肽切割条件(如上所述)。

[0234] 在标准裂解程序后,将F1粗肽溶于水中并在RP-HPLC上纯化。鉴定含有纯化靶标肽的级分,然后将选定的级分合并并冻干。

[0235] 合成CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR-NH_2(肽F2-SEQ ID NO: 2):

[0236] 使用RINK酰胺树脂,通过如上所述的标准Fmoc-SPPS制备肽F2(CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR-NH_2)。

[0237] 在标准裂解程序后,将F2粗肽溶于水中并在RP-HPLC上纯化。鉴定含有纯化靶标肽的级分,然后将选定的级分合并并冻干。

[0238] 小鼠

[0239] C57/B16J小鼠(8至12周龄)从Charles River Laboratories购买。所有实验均使用雌雄小鼠。由于雄性和雌性之间没有发现差异,因此将两性的数据合并起来。小鼠饲养在标准饲养条件下(22℃、40%湿度、12小时光照周期、自由获取食物和水)。我们特别努力地减少本研究中使用的小鼠数量,以及它们所承受的压力和痛苦。所有实验均按照欧洲实验动物护理和使用指南(理事会指令86/609/EEC)进行。所有实验程序均经过动物实验独立伦理委员会(APAFIS)的批准,符合法国法律的要求并符合法国动物实验立法的相关机构规定。所有实验均按照ARRIVE指南进行。

[0240] 疼痛模型1:保留神经损伤(SNI)模型-神经病理性疼痛。

[0241] 使用了Decosterd and Woolf,2000;Pain,Vol.87,p 149-158开发的保留神经损伤(SNI)模型;它被用作神经病理性疼痛模型。SNI模型包括胫骨分支和坐骨神经的腓总神经的横断:腓肠神经保持完整。后者随后会发生神经病理性疼痛的症状,并伴有严重的机械性痛觉超敏。SNI模型有很多优点:

[0242] -神经病理性疼痛是持续性的。这使得我们能够掌握重复注射肽后的习惯现象。

[0243] -产生的痛苦是强烈的。

[0244] -模型具有很强的可重复性。

[0245] 用氯胺酮(100mg/kg IP)和赛拉嗪(10mg/kg IP)麻醉小鼠,并在无菌条件下暴露左侧坐骨神经。确定坐骨神经远端三分叉,用聚丙烯不可吸收6-0缝线(Ethicon)结扎胫骨分支和腓总分支;切除1mm,使腓肠分支保持完整。用缝线缝合伤口,让动物恢复并放回它们的笼子里。

[0246] 疼痛模型2:爪切口——术后疼痛。

[0247] 爪切口手术按照Brennan及其同事(1999)(Brennan,1999)描述的方式进行。用氯胺酮(100mg/kg IP)和赛拉嗪(10mg/kg IP)麻醉小鼠,并沿右后爪的皮肤和筋膜进行纵向切口。使用镊子纵向提起屈趾短肌,并用手术刀在肌肉上切开,将其切成两半。用缝线缝合伤口,让动物恢复并放回它们的笼子里。爪切口作为术后疼痛模型。

[0248] 疼痛模型3:角叉菜胶注射——炎症性疼痛。

[0249] 发明人使用Hamilton注射器将1x PBS中的20μl 1%λ-角叉菜胶(Sigma-Aldrich,22049-5G-F)注射到小鼠左后爪的足底表面。使用角叉菜胶注射作为炎症疼痛模型。

[0250] 疼痛模型4:慢性收缩损伤(CCI)模型-神经病理性

[0251] CCI神经病理性疼痛模型:慢性压迫性损伤(CCI)按照Bennett和Xie1988(Aperipheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those in man.Pain vol 33:pp87-107)先前描述的进行。简而言之,用氯胺酮/赛拉辛(Xylasine)(分别为100mg/kg和10mg/kg ip)麻醉小鼠,并用两根结扎线(6-0Monocryl,Ethicon)松散地(间距约1mm)绑在坐骨总神经周围,诱发单侧外周单神经病。神经收缩到几乎难以察觉的程度,因此神经外血管系统的循环不会中断。

[0252] 疼痛模型5:辣椒素炎症性疼痛。

[0253] 将辣椒素(Sigma)储备溶液(溶于16.7mg/mL无水乙醇中)以0.25mg/mL稀释在0.9% NaCl中,然后使用Hamilton注射器和26G针头将10μL注射到小鼠左后爪的足底表面。

[0254] 疼痛模型6:骨关节炎疼痛模型(单碘乙酸盐模型)。

[0255] MIA模型是啮齿动物骨关节炎中关节破坏的标准模型。简而言之,用氯胺酮(100mg/kg IP)和甲苯噻嗪(10mg/kg IP)麻醉小鼠,然后使用Hamilton注射器和26G针头将0.9% NaCl中的1mg/10μL MIA(单碘乙酸盐,Sigma)注射到小鼠左后爪膝盖的滑液中,如Pitcher等人(2016)所述。

[0256] 疼痛模型7:紫外线烧伤疼痛模型

[0257] 用氯胺酮(100mg/kg IP)和甲苯噻嗪(10mg/kg IP)麻醉小鼠,并完全覆盖,只留下一只后爪的足底侧。使用波长为312nm的UV灯(VL-215.MC Vilmer)在20cm的距离照射爪60分钟。一旦醒来,将动物放回其笼子。

[0258] 疼痛模型8:冻伤疼痛模型

[0259] 用氯胺酮(100mg/kg Ip)和甲苯噻嗪(10mg/kg IP)麻醉小鼠。将后爪经由置于干冰中的铜管暴露于冷,并通过NaCl浸泡的滤纸片接触40秒。一旦醒来,将动物放回其笼子。

[0260] VonFrey测试

[0261] Von Frey使用Von Frey(VF)毛或纤维(即小段尼龙棒,长度约为50mm)来测试啮齿动物对机械刺激的敏感性。在这个测试中,动物站在一个升高的网状平台上,将Von Frey毛通过网插入动物的后爪。动物的正常反应包括缩回或舔或摇晃爪子。采用“上下”Von Frey法来确定引起50%动物的缩爪反应所需的机械力。这里,将小鼠放置在金属丝网上的塑料室中,并用“上下”方法(45)用von Frey细丝(Vivotech)进行刺激,从1g细丝开始,并使用0.04和4g细丝作为截止。

[0262] 统计分析

[0263] 结果以平均值±SEM表示。使用Prism 7(Graphpad Software,La Jolla,加利福尼

亚州,美国)进行统计分析。

[0264] 结果

[0265] 实施例1:疼痛模型1:保留神经损伤(SNI)模型-神经病理性疼痛。

[0266] 1.1 TAFA-4全长蛋白("TAFA-4 FL")和SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2的两种肽的组("肽1+2")在皮下施用的情况下的镇痛效果的比较。

[0267] 这些实验的目的是评估根据本发明的两种肽的组(该组在本文中被标识为"肽1+2"或"肽F1+F2")通过皮下注射在神经病理性疼痛的保留神经损伤(SNI)模型中的镇痛效果,并将该效果与用TAFA-4全长蛋白("TAFA-4FL")获得的效果进行比较。

[0268] 实验是在八周大的雄性WT C57B16小鼠上进行的。使用了四组老鼠,每组6至12只。将SEQ ID NO:1的肽和SEQ ID NO:2的肽以[0.6mg/mL]重悬于0.9%NaCl中。稀释两种肽以获得等效摩尔浓度(对于SEQ ID NO:1的肽为12.8μg/ml,对于SEQ ID NO:2的肽为17.2μg/ml),以便其以0.3mg/kg的"肽1+2"的最终总浓度在本研究中使用。相似地,将TAFA-4FL重悬于0.9% NaCl中,稀释并以0.3mg/kg的最终浓度使用。

[0269] 0.9%NaCl溶液用作阴性对照(载体),3mg/kg普瑞巴林(用于治疗神经病理性疼痛的众所周知的药物)用作阳性对照。

[0270] 通过上/下法用Von Frey(VF)细丝测量小鼠的基准阈值("基线")[显示了在不同条件下,引起50%的小鼠出现缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量当量)随时间的变化],建立SNI模型。将小鼠麻醉;进行胫神经和腓骨神经的结扎;然后切断这两条神经。完整的腓肠神经会很快发生神经病变。术后3天确定是否发生神经病变。从而观察到对同侧爪子的Von Frey细丝的反应阈值降低。

[0271] 手术后14天,再次测量反应阈值(参见图1中的"D14")。然后,实验人员将100μl/10g分别包含两种肽的组、TAFA-4全长蛋白、媒介物或普瑞巴林的每种溶液盲皮下注射至小鼠。

[0272] 反应阈值在施用/注射后1小时、2小时然后4小时后测量。

[0273] 在SNI后第14天,与基线阈值相比,所有小鼠的机械阈值表现出急剧的下降,说明了强烈的机械性超敏反应(参见图1)。皮下施用该载体无效果。令人惊讶的是,在施用后1小时,SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽("肽1+2")的组/组合物的镇痛效果最大,并且显著高于TAFA-4全长蛋白("TAFA4FL")的镇痛效果(p值<0.01),并且也高于普瑞巴林。统计分析显示两种肽的组/组合物与阴性对照(媒介物)相比,1小时和2小时的结果有很强的显著性(p值<0.001)。

[0274] 1.2 TAFA-4全长蛋白("TAFA-4 FL")和SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2的两种肽的组("肽1+2")在经口施用的情况下的镇痛效果的比较。

[0275] 除了使用经口施用在术后14天完成两种肽的组、TAFA-4FL、媒介物和普瑞巴林的施用,使用1.1中描述的方案进行。

[0276] 对于经口施用,将SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽以30μg/mL的浓度稀释在1%w/v羟丙基甲基纤维素(Sigma-aldrich#423238,批号MKCD3665)、0.5%v/v Tween 80(Euromedex#2002-A,批号100412/16S407)溶液中,下文中称为HPMC溶液或"媒介物"。相似的方案应用于TAFA-4FL。

[0277] 使用两根灌胃针口服施用媒介物、TAFA-4FL溶液和包含这两种肽的组的溶液。普

瑞巴林(3mg/kg)由一位与进行VF测量的实验者不同的实验者通过口服灌胃(经口)施用,以便后者对治疗进行盲测(每个治疗n=8)。手术后14天进行施用。

[0278] 在SNI后第14天,所有小鼠的机械阈值展现出急剧的下降(图2)。口服施用该载体无效果。TAFA-4全长蛋白口服(即,经口)施用时未表现出显著的镇痛效果。令人惊讶的是,口服施用本发明的两种肽的组/组合物在施用后1小时立即诱导对机械阈值的统计学上显著的逆转作用(p值<0.01),其中最大作用发生在施用后2小时(p值<0.001)。在施用后1小时和2小时,本发明的两种肽的组/组合物的镇痛效果与普瑞巴林的镇痛效果相似,然而在施用后2小时,其显著高于TAFA-4全长蛋白("TAFA4FL")的镇痛效果。从图2可得出结论,本发明的两种肽的组/组合物经口施用时具有比TAFA-4全长蛋白更好的镇痛效果。

[0279] 1.3静脉施用SEQIDNO:1和SEQ ID NO: 2的两种肽的组("肽1+2")的镇痛效果

[0280] 使用1.1中描述的方案,除了使用静脉途径在术后14天完成两种肽的组或媒介物的施用。

[0281] 将SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽以150μg/mL的总浓度重悬于0.9% NaCl中。

[0282] 如前所述,采用上/下法进行Von Frey细丝测量以确定基线。然后,SNI模型就放置到位了。测量手术后十四天(14天-D14)的反应阈值,以检查神经病理性疼痛的发生。然后,在尾静脉中缓慢进行20μL/10g包含总浓度为300μg/kg的两种肽的组的溶液的盲注射。反应阈值在静脉施用后1小时、2小时然后4小时后测量。还静脉施用了媒介物(n=11)。

[0283] 在SNI后第14天,与基线阈值相比,所有小鼠的机械阈值表现出急剧的下降,说明了强烈的机械性超敏反应(图3)。静脉施用该媒介物无效果。令人惊讶的是,观察到SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组("肽1+2")具有强而显著的镇痛效果,在2h观察到对机械阈值的最大逆转效应(p<0.001)。

[0284] 总而言之,本实验显示本发明的两种肽的组在SNI模型(神经病理性疼痛模型)中通过皮下、经口和静脉施用诱导了镇痛效果。有利的是,当皮下施用时,本发明的两种肽的组的极早期(即,施用后1h)的镇痛效果比用TAFA-4(全长)蛋白观察到的镇痛效果更显著。甚至更令人惊奇的是,本发明的两种肽的组当经口施用时,在施用后2h表现出比TAFA-4(全长)蛋白更好的镇痛效果。

[0285] 发明人的结果证明了SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组在神经病理性疼痛模型中的镇痛效果。该模型诱导的机械性痛觉超敏(降低的疼痛敏感阈值)可通过皮下、静脉或口服(经口)施用本发明的肽的组降低。

[0286] 有利地,本发明的两种肽的组或包含此类组的组合物,不仅比全长TAFA-4蛋白更容易生产(并且因此更便宜),并且当皮下施用时,与后者相比,其诱导更高的镇痛活性/效果。更令人惊奇的是,当口服(经口)施用时,本发明的肽的组与TAFA-4(全长)蛋白相比表现出更好的镇痛效果,这使得它比所述TAFA-4全长蛋白更方便和适合施用于患者。静脉内注射两种肽的组有利地提供了用于治疗神经病理性疼痛的第三施用途径。

[0287] 实施例2:爪切口-术后疼痛-

[0288] 这些实验的目的是评估根据本发明的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的两种肽的组(该组在本文中被标识为"肽1+2")在术后疼痛模型(Brennan爪切口模型)中通过皮下注射的镇痛效果。

[0289] 实验在八周大的雄性和雌性小鼠WT C57B16上进行。12只雄性和12只雌性用于"肽

1+2”治疗的组,而11只雄性和11只雌性用于媒介物组。将SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽以[4mg/mL]重悬于超纯水中。在本研究中,将两种肽稀释以获得0.3mg/kg的“肽1+2”的最终总浓度。

[0290] 在不同时间点,:手术前一天(D-1)、手术当天(D0)以及手术后D+1和D+2,每天两次皮下施用“肽1+2”或媒介物。D0的施用分别在手术前1小时和手术后(和醒来)1小时进行。机械阈值反应测量在D+1(D+1时注射之前)、D+2(D+2时注射之前)和D+3进行(图4A)。

[0291] 切开爪口后,用媒介物治疗的小鼠发展出机械性痛觉超敏(见图4B中的D+1、D+2和D+3)。相反,用“肽1+2”治疗的小鼠并没有发展出机械性痛觉超敏。与用媒介物治疗的小鼠相比,“肽1+2”治疗的小鼠在D+1、D+2和D3时表现出统计学上显著更高的反应阈值(图4B)。

[0292] 这些结果表明,本发明的肽的组可以在爪切口模型(术后疼痛模型)中用作镇痛剂。

[0293] 实施例3:慢性收缩损伤(CCI)神经病理性疼痛模型中缺乏耐受性。

[0294] 该实验的目的是评估用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组(“肽1+2”)治疗的受试者在重复皮下施用该肽的组后是否可以诱导针对该肽的组的耐受性。

[0295] 将CCI模型放置到根据上述方案的地点。从术后D7开始,小鼠连续14天每天两次皮下注射“肽1+2”(0.3mg/kg)。在手术前和手术后7天,使用Von Frey细丝通过上/下法测试机械敏感性,以验证CCI诱导的机械痛觉超敏。时程反应在首次施用后进行。然后,每隔一天,测试“肽1+2”的镇痛效果。然后,在最后一次施用(D20)后,进行完整的时程反应(图5A)。在D+30(治疗结束后10天)进行最后一次测量,以验证小鼠的正确恢复。

[0296] 第一次皮下注射“肽1+2”诱导反应(即,缩爪)阈值的强烈增加,证明了“肽1+2”的镇痛效果(图5B-在“前药”条件下测量的反应与第一次注射施用后两小时测量的反应之间的比较)。有趣的是,“肽1+2”的镇痛效果在整个治疗持续时间(14天)内保持恒定,没有任何功效降低,即使在对应于D20的最后一次注射时(图5B,作为第一次注射测量的反应相比于在最后一次注射测量的反应之间没有显著差异)。这些结果表明,本发明的肽可以在很长一段时间内重复使用,而不会诱导受试者的耐受性。

[0297] 实施例4:不同剂量治疗术后疼痛模型的比较-预防效果

[0298] 本实验的目的是测试SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组(“肽1+2”)在术后疼痛模型中体内皮下施用时,用于治疗患有术后疼痛的受试者的不同剂量。

[0299] “肽1+2”或媒介物根据三种不同方案每天两次皮下施用。“D-1/D0”方案:手术前一天(D-1)和手术当天(D0)进行施用;“D0”方案:手术当天(D0)进行施用;“D0/D+1/D+2”方案:手术前一天(D-1)、手术当天(D0)以及手术后D+1和D+2天进行施用。D0的施用分别在手术前1小时和手术后(和醒来)1小时进行。在施用两种肽的组或媒介物之前,在D+1天和D+2进行机械阈值反应测量(图6A)。

[0300] 切开爪口后,用媒介物治疗的小鼠发展出机械性痛觉超敏(见图6B中的D+1、D+2和D+3)。相反,用“肽1+2”治疗的小鼠并没有发展出机械性痛觉超敏,无论使用的方案是什么。有趣的是,用手术后未治疗的“D-1/D0”和“D0”方案治疗的小鼠没有发展出机械性痛觉超敏,从而表明本发明的肽的组可以预防性地用于爪切口模型(术后疼痛模型)。

[0301] 实施例5:炎症性疼痛模型中的镇痛效果

[0302] 本实验的目的是评估SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组(肽1+2)在炎症性疼痛

模型(辣椒素炎症性疼痛模型)中体内静脉施用的镇痛效果。

[0303] 实验在八周大的雄性WT C57B16上进行。使用了两组小鼠,每组8只。将“肽1+2”以30μg/mL的浓度重悬于HMPC溶液中,每克注射10μl。

[0304] 将辣椒素(Sigma)储备溶液(溶于16.7mg/mL无水乙醇中)以0.25mg/mL稀释在0.9% NaCl中,然后使用Hamilton注射器和26G针头将10μL注射到小鼠左后爪的足底表面。如前所述,用Von Frey细丝通过上/下法用进行测量以确定基线。在注射辣椒素(D+1)后24h,两组小鼠分别用“肽1+2”或媒介物治疗。反应阈值在皮下施用0.3mg/kg的“肽1+2”溶液(n=8)或媒介物溶液(n=8)后1小时(+1h)、2小时(+2h)然后4小时(+4h)测量。

[0305] 在注射辣椒素后24h,小鼠发展出机械性痛觉超敏(参见D+1-图7),而皮下施用本发明的肽的组在施用后2小时诱导反应阈值的统计学显著增加。

[0306] 这些结果表明,本发明的肽的组在辣椒素模型(炎症性疼痛模型)中经由皮下施用导致镇痛效果。

[0307] 实施例6:骨关节炎疼痛模型中的镇痛效果

[0308] 本实验的目的是评估SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组(肽1+2)在骨关节炎疼痛模型(单碘乙酸盐)中体内皮下施用的镇痛效果。

[0309] 使用了两组小鼠,每组8只。在将单碘乙酸盐(MIA)注射到每个组之前和之后的14天,使用Von Frey细丝通过上/下法测试机械敏感性。在MIA后24h,两组小鼠分别用“肽1+2”或媒介物(NaCl溶液)治疗。进行时程反应以追踪“肽1+2”的镇痛效果。反应阈值在施用“肽1+2”或媒介物后1小时(+1h)、2小时(+2h)然后4小时(+4h)测量。

[0310] 在MIA注射后第14天,与基线阈值相比,所有小鼠的机械阈值表现出急剧的下降,说明了强烈的机械性超敏反应(图8)。皮下施用该媒介物没有镇痛效果。相反,在施用后1小时和2小时,与阴性对照(媒介物)相比,“肽1+2”的镇痛效果具有统计学显著性(图8)。

[0311] 这些结果表明,本发明的肽的组在关节炎模型中经由皮下施用导致镇痛效果。

[0312] 实施例7:冻伤疼痛模型中的镇痛效果。

[0313] 本实验的目的是评估SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组(肽1+2)在冻伤疼痛模型中体内皮下施用的镇痛效果。

[0314] 使用了两组小鼠,每组16只。每组有8只雄性和8只雌性。在冷暴露之前(基线)和之后的24h(D+1),使用Von Frey细丝通过上/下法测试机械敏感性。在冷暴露后24h施用“肽1+2”或媒介物(NaCl溶液)后,进行时程反应以追踪施用后1小时(D1+1)、2小时(D1+2h)和4小时(D1+4h)的“肽1+2”的镇痛效果。

[0315] 在冷暴露后24小时,与基线阈值相比,所有小鼠的机械阈值表现出急剧的下降,说明了强烈的机械性超敏反应(图9)。皮下施用该媒介物没有镇痛效果。相反,在施用后1小时和2小时,与阴性对照(媒介物)相比,“肽1+2”的镇痛效果具有统计学显著性(图9)。

[0316] 这些结果表明,本发明的肽的组在冻伤(或冰烧伤)模型中经由皮下施用导致镇痛效果。这种模型也被认为是急性疼痛模型的类型。

[0317] 实施例8:紫外线烧伤疼痛模型中的镇痛效果

[0318] 本实验的目的是评估SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的肽的组(肽1+2)在紫外线烧伤疼痛模型(也称为晒伤疼痛模型)中体内皮下施用的镇痛效果。

[0319] 使用了两组小鼠,每组16只。每组有8只雄性和8只雌性。在紫外线照射之前(基线)

和之后的24h(D+1),使用Von Frey细丝通过上/下法测试机械敏感性。在施用“肽1+2”或媒介物(NaCl溶液)后,进行时程反应以追踪“肽1+2”施用后1小时(D1+1h)、2小时(D1+2h)和4小时(D1+4h)的镇痛效果。

[0320] 在紫外线照射后24小时,与基线阈值相比,所有小鼠的机械阈值表现出急剧的下降,说明了强烈的机械性超敏反应(图10)。皮下施用该媒介物没有镇痛效果。相反,在施用后1小时和2小时,与阴性对照(媒介物)相比,该组“肽1+2”的镇痛效果具有统计学显著性(图10)。

[0321] 这些结果表明,本发明的肽的组在UV烧伤(或太阳烧伤)疼痛模型中经由皮下施用导致镇痛效果。这种模型也被认为是急性疼痛模型的类型。

[0322] 参考文献

[0323] Benyamin,R.,Trescot,A.M.,Datta,S.,Buenaventura,R.,Adlaka,R.,Sehgal,N.,Glaser,S.E.,and Vallejo,R.(2008).Opioid complications and side effects.Pain Physician 11,S105-120.

[0324] Bourane,S.,Duan,B.,Koch,S.C.,Dalet,A.,Britz,O.,Garcia-Campmany,L.,Kim,E.,Cheng,L.,Ghosh,A.,Ma,Q.,et al.(2015a).Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons.Science 350,550-554.

[0325] Bourane,S.,Grossmann,K.S.,Britz,O.,Dalet,A.,Del Barrio,M.G.,Stam,F.J.,Garcia-Campmany,L.,Koch,S.,and Goulding,M.(2015b).Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control.Cell 160,503-515.

[0326] Boyle,K.A.,Gradwell,M.A.,Yasaka,T.,Dickie,A.C.,Polgar,E.,Ganley,R.P.,Orr,D.P.H.,Watanabe,M.,Abraira,V.E.,Kuehn,E.D.,et al.(2019).Defining a Spinal Microcircuit that Gates Myelinated Afferent Input:Implications for Tactile Allodynia.Cell reports 28,526-540e526.

[0327] Colloca,L.,Ludman,T.,Bouhassira,D.,Baron,R.,Dickenson,A.H.,Yarnitsky,D.,Freeman,R.,Truini,A.,Attal,N.,Finnerup,N.B.,et al.(2017).Neuropathic pain.Nat Rev Dis Primers 3,17002.

[0328] Costigan,M.,Scholz,J.,and Woolf,C.J.(2009).Neuropathic pain:a maladaptive response of the nervous system to damage.Annu Rev Neurosci 32,1-32.

[0329] Coull,J.A.,Beggs,S.,Boudreau,D.,Boivin,D.,Tsuda,M.,Inoue,K.,Gravel,C.,Salter,M.W.,and De Koninck,Y.(2005).BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain.Nature 438,1017-1021.

[0330] Delfini,M.C.,Mantilleri,A.,Gaillard,S.,Hao,J.,Reynders,A.,Malapert,P.,Alonso,S.,Francois,A.,Barrere,C.,Seal,R.,et al.(2013).TAFA4,a chemokine-like protein,modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice.Cell reports 5,378-388.

[0331] Duan,B.,Cheng,L.,Bourane,S.,Britz,O.,Padilla,C.,Garcia-Campmany,L.,Krashes,M.,Knowlton,W.,Velasquez,T.,Ren,X.,et al.(2014).Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain.Cell 159,1417-1432.

[0332] Goh,EL.,Chidambaram,S.,Ma,D.(2017).Complex regional pain syndrome:a recent update.Burns&Trauma 5:2.

[0333] Leroux,Maria Bibiana(2018).Erythromelalgia:a cutaneous manifestation of neuropathy?An Bras Dermatol.93(1):86-94.

[0334] Ngo,AL.,Urits,I.,Yilmaz,M.,Fortier,L.,Anya,A.,Oh,JH.,Berger,AA.,Kassem,H.,Sanchez,MG.,Kaye,AD,et al.(2020).Postherpetic Neuralgia:Current Evidence on the Topical Film-Forming Spray with Bupivacaine Hydrochloride and a Review of Available Treatment Strategies.Adv Ther.37(5):2003-2016.

[0335] Peirs,C.,Williams,S.P.,Zhao,X.,Walsh,C.E.,Gedeon,J.Y.,Cagle,N.E.,Goldring,A.C.,Hioki,H.,Liu,Z.,Marell,P.S.,et al.(2015).Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain.Neuron 87,797-812.

[0336] Petitjean,H.,F,B.B.,Tsao,D.,Davidova,A.,Sotocinal,S.G.,Mogil,J.S.,Kania,A.,and Sharif-Naeini,R.(2019).Recruitment of Spinoparabrachial Neurons by Dorsal Horn Calretinin Neurons.Cell reports 28,1429-1438 e1424.

[0337] Petitjean,H.,Pawlowski,S.A.,Fraine,S.L.,Sharif,B.,Hamad,D.,Fatima,T.,Berg,J.,Brown,C.M.,Jan,L.Y.,Ribeiro-da-Silva,A.,et al.(2015).Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury.Cell reports 13,1246-1257.

[0338] Sarver,D.C.,Lei,X.,and Wong,G.W.(2021).FAM19A(TAFA):An Emerging Family of Neurokines with Diverse Functions in the Central and Peripheral Nervous System.ACS Chem Neurosci 12,945-958.

[0339] Siracusa,R.,Di Paola,R.,Cuzzocrea,S.,Impellizzeri,D.(2021).Fibromyalgia:Pathogenesis,Mechanisms,Diagnosis and Treatment Options Update.Int J Mol Sci.22(8):3891.

[0340] Tom Tang,Y.,Emtage,P.,Funk,W.D.,Hu,T.,Arterburn,M.,Park,E.E.,and Rupp,F.(2004).TAFA:a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain.Genomics 83,727-734.

[0341] Zeilhofer,H.U.,Wildner,H.,and Yevenes,G.E.(2012).Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control.Physiol Rev 92,193-235.

[0342] Zhang,Y.,Liu,S.,Zhang,Y.Q.,Goulding,M.,Wang,Y.Q.,and Ma,Q.(2018).Timing Mechanisms Underlying Gate Control by Feedforward Inhibition.Neuron99,941-955 e944.

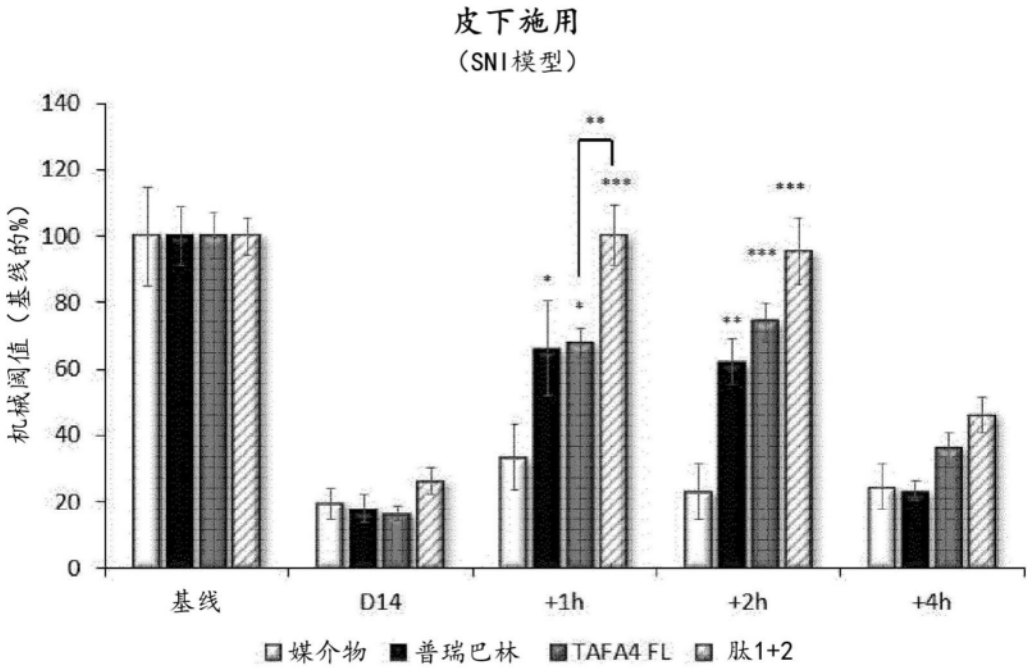

皮下施用
(SNI模型)
机械阈值（基线的%）
140
120
100
80
60
40
20
0
基线
D14
+1h
+2h
+4h
媒介物
普瑞巴林
TAFA4 FL
肽1+2

图1

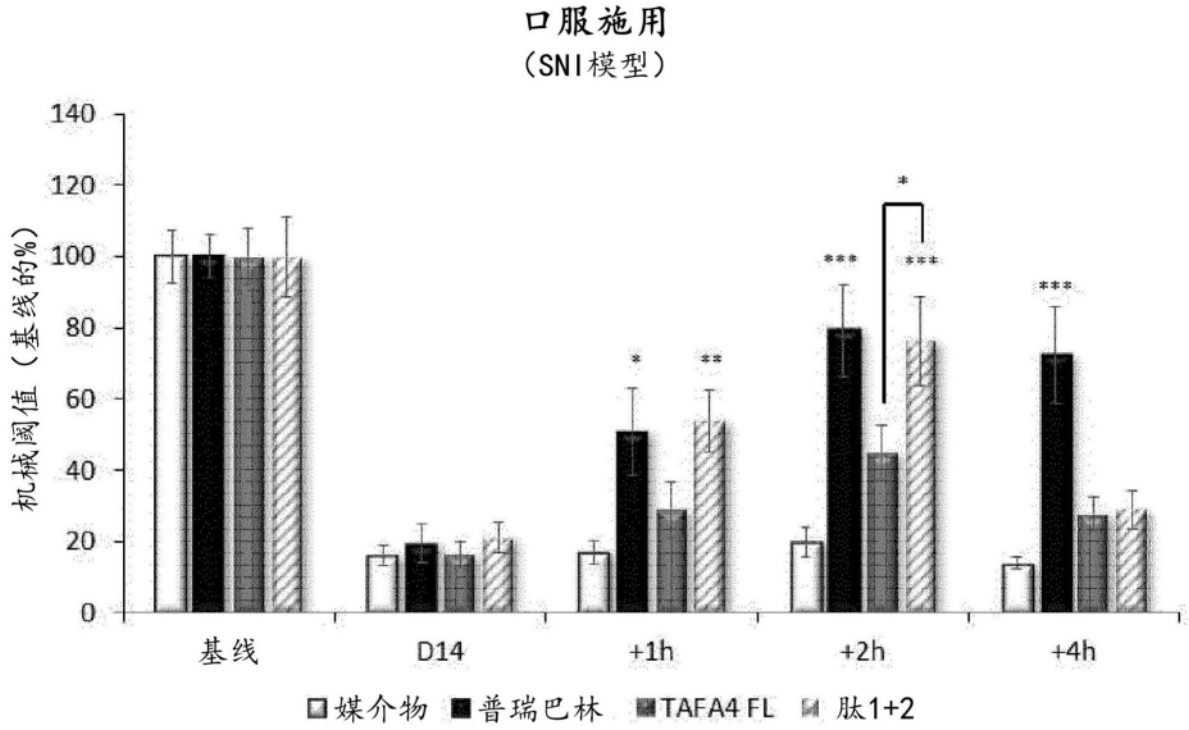

口服施用
(SNI模型)
机械阈值（基线的%）
140
120
100
80
60
40
20
0
基线
D14
+1h
+2h
+4h
媒介物
普瑞巴林
TAFA4 FL
肽1+2

图2

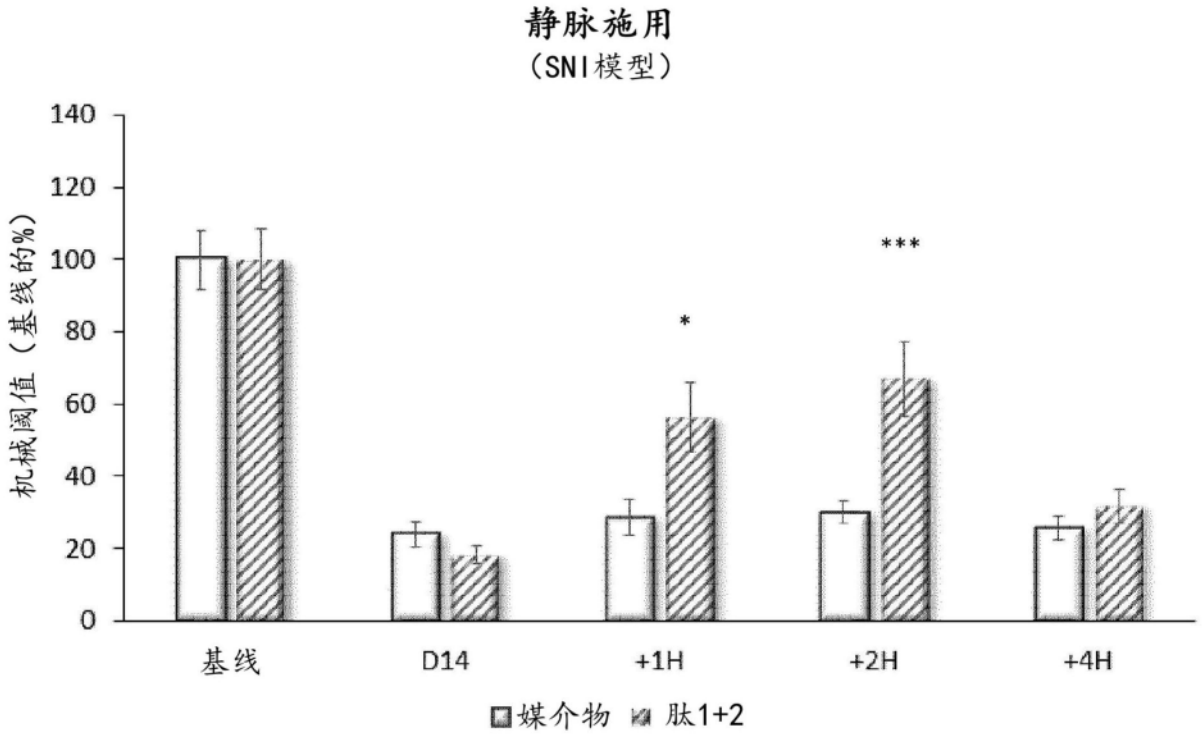

静脉施用
（SNI模型）
机械阈值（基线的%）
140
120
100
80
60
40
20
0
*
***
基线
D14
+1H
+2H
+4H
媒介物
肽1+2

图3

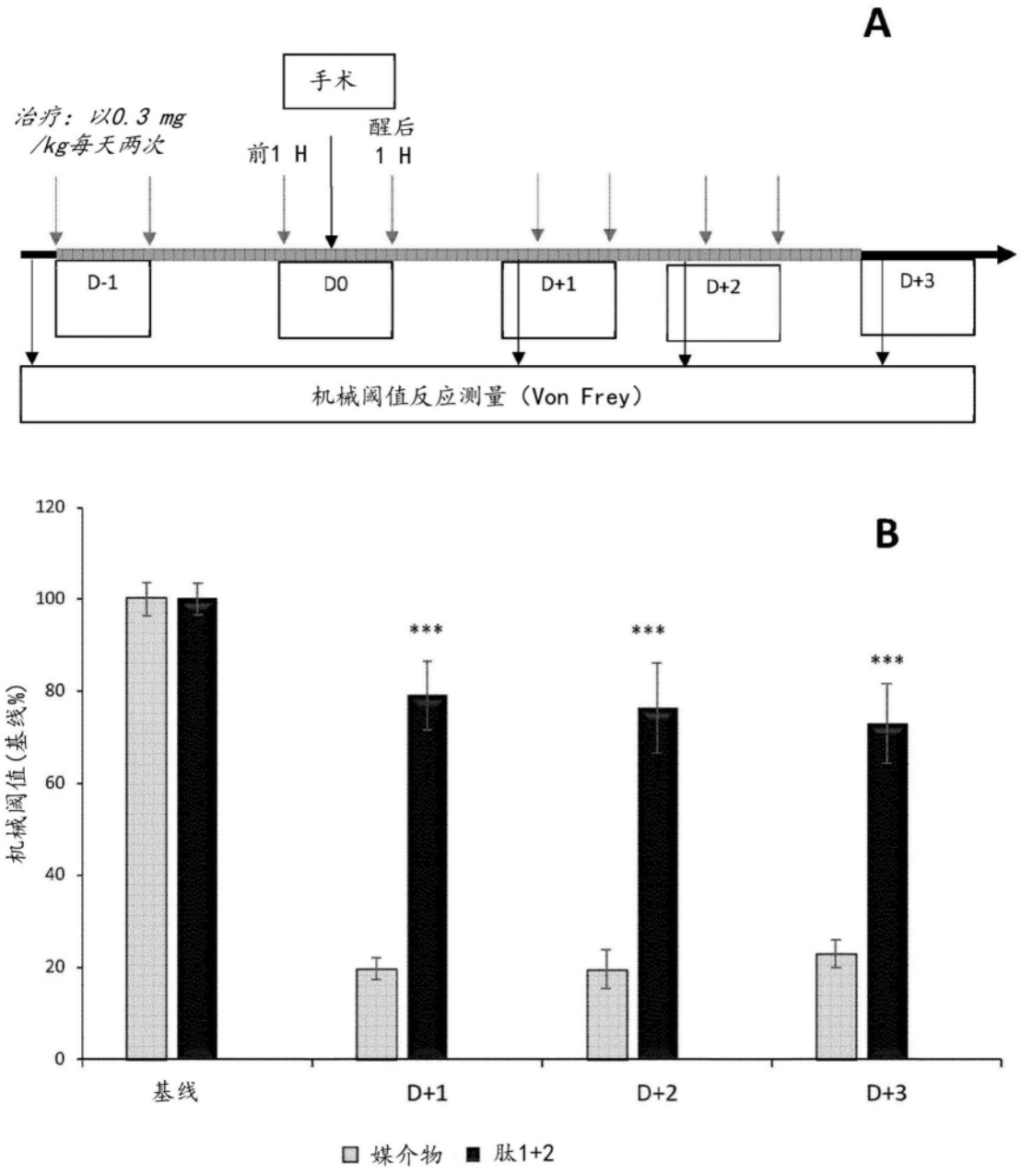

A
手术
治疗：以0.3 mg /kg每天两次
前1 H
醒后 1 H
D-1
D0
D+1
D+2
D+3
机械阈值反应测量（Von Frey）
B
机械阈值(基线%)
120
100
80
60
40
20
0
***
***
***
基线
D+1
D+2
D+3
媒介物
肽1+2

图4

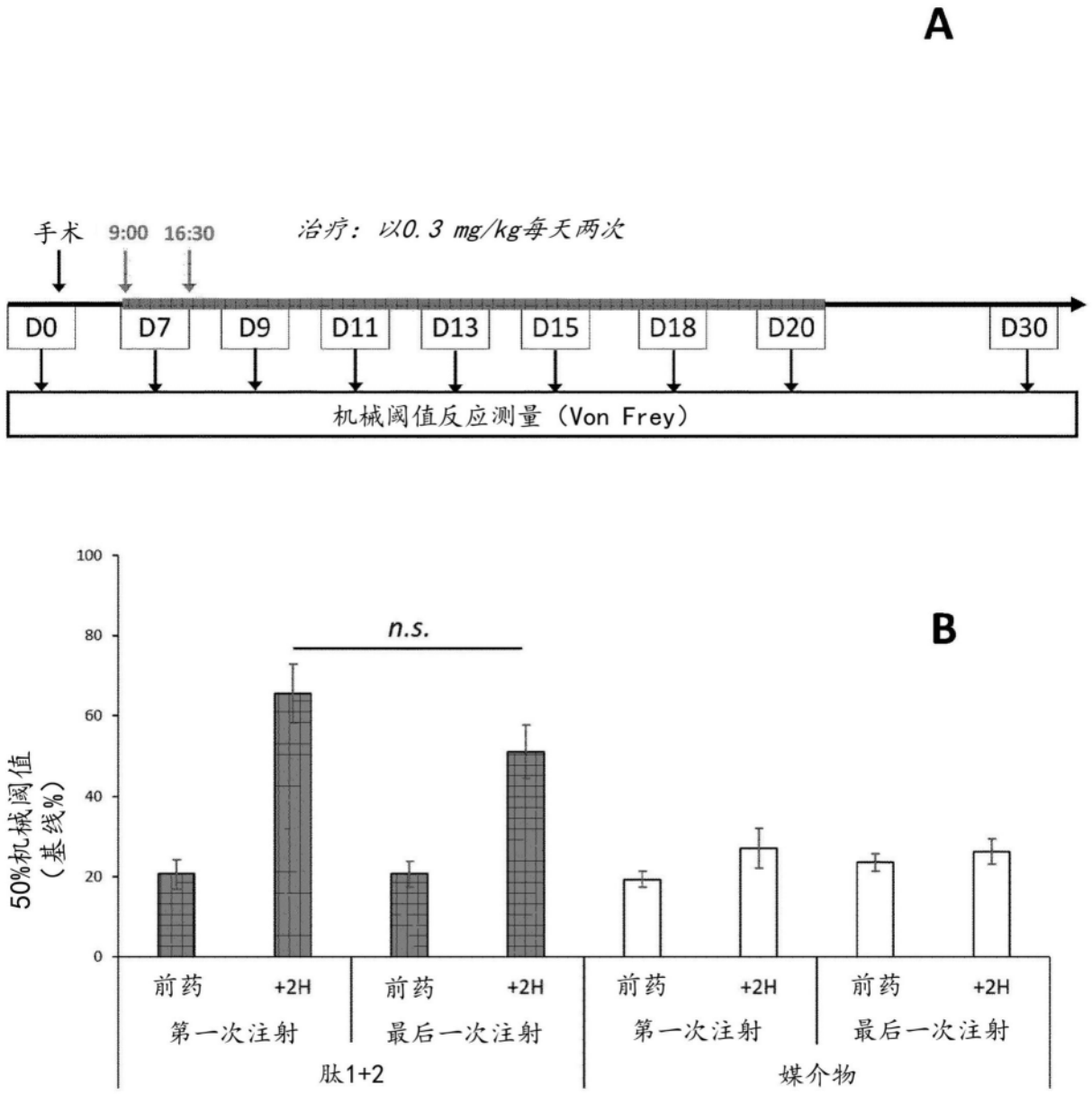

A
手术
9:00
16:30
治疗：以0.3 mg/kg每天两次
D0
D7
D9
D11
D13
D15
D18
D20
D30
机械阈值反应测量（Von Frey）
B
n.s.
50%机械阈值
（基线%）
100
80
60
40
20
0
前药
+2H
第一次注射
最后一次注射
肽1+2
媒介物

图5

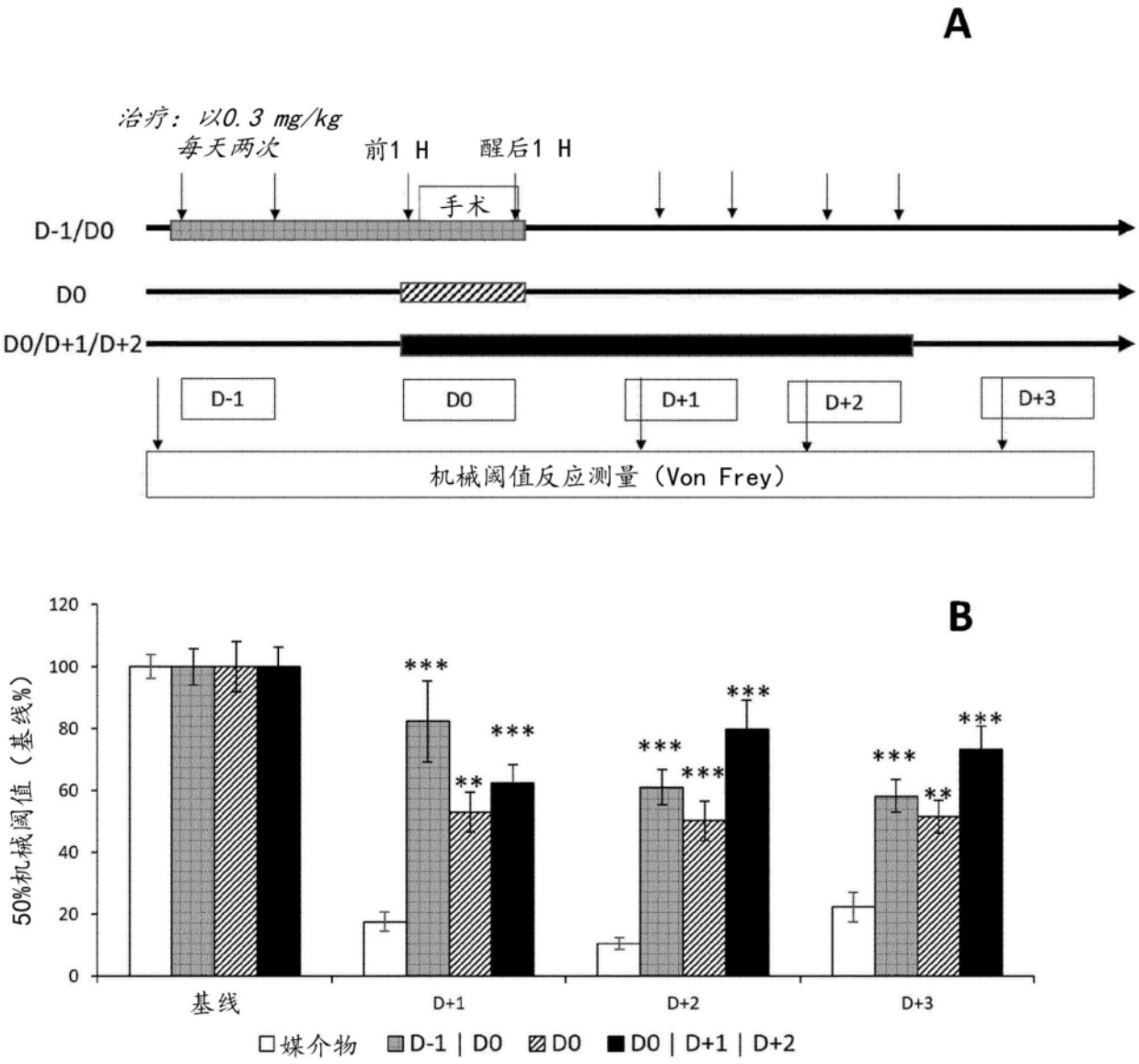

A
治疗：以0.3 mg/kg
每天两次
前1 H
醒后1 H
手术
D-1/D0
D0
D0/D+1/D+2
D-1
D0
D+1
D+2
D+3
机械阈值反应测量（Von Frey）
B
50%机械阈值（基线%）
120
100
80
60
40
20
0
***
**
基线
D+1
D+2
D+3
□媒介物 D-1 | D0 D0 D0 | D+1 | D+2

图6

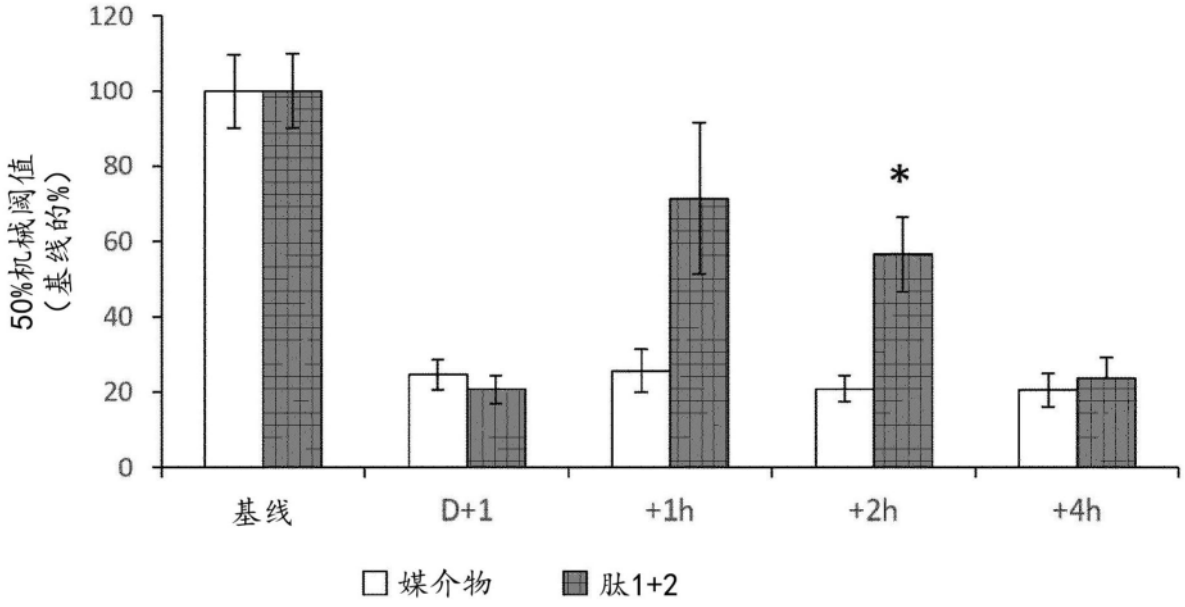

120
100
80
60
40
20
0
50%机械阈值
（基线的%）
*
基线
D+1
+1h
+2h
+4h
媒介物
肽1+2

图7

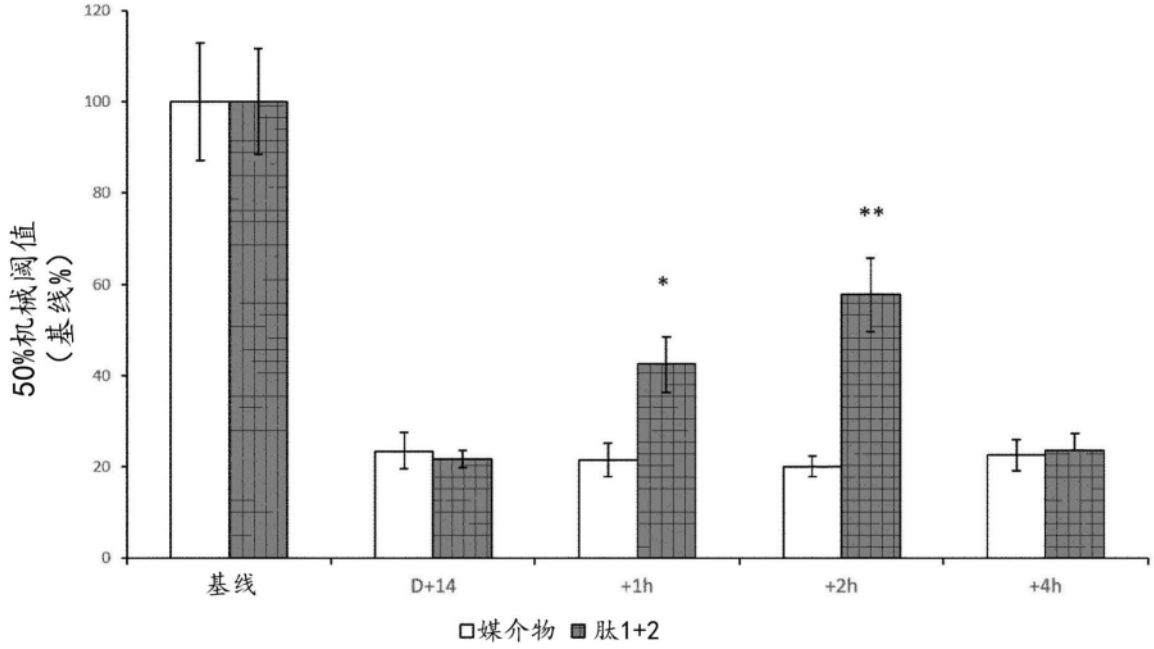

120
100
80
60
40
20
0
50%机械阈值
（基线%）
*
**
基线
D+14
+1h
+2h
+4h
媒介物
肽1+2

图8

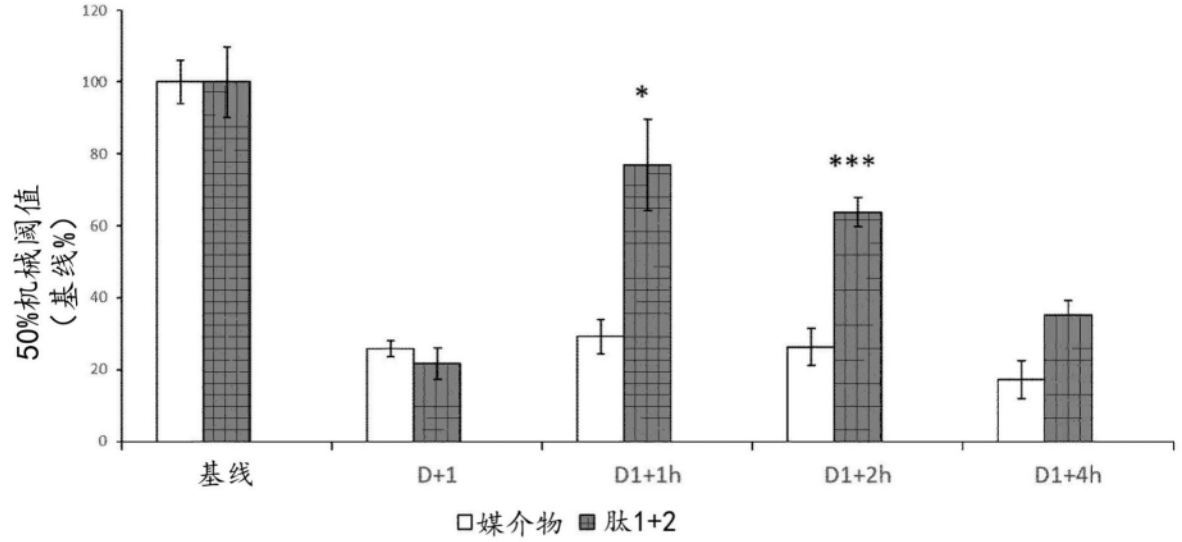

120
100
80
60
40
20
0
50%机械阈值
（基线%）
*
***
基线
D+1
D1+1h
D1+2h
D1+4h
媒介物
肽1+2

图9

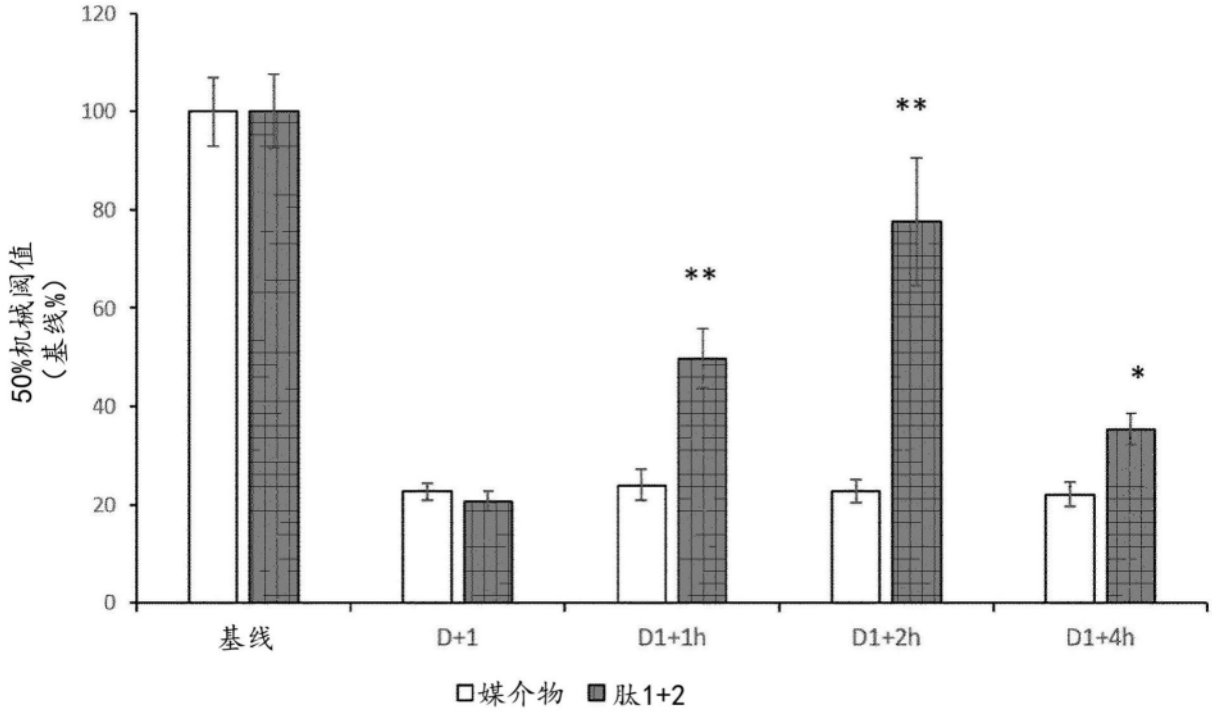

120
100
80
60
40
20
0
50%机械阈值
（基线%）
**
**
*
基线
D+1
D1+1h
D1+2h
D1+4h
媒介物
肽1+2

图10